Leiden, 1960 Lane v Exch

HISTOCHEMISCH ONDERZOEK VAN DE ACTIVITEIT VAN ALKALISCHE EN ZURE FOSFATASE IN NORMAAL EN IN PATHOLOGISCH VERANDERD MENSELIJK WEEFSEL

R. G. J. WILLIGHAGEN

LANE LIBRARY. STANFORD UNIVERSITY.

STELLINGEN

I

Voor een optimale diagnostiek is het noodzakelijk, dat operatiepreparaten, en weefsel afkomstig van proefexcisies en microcurettages, de pathologanatoom onmiddellijk ongefixeerd ter beschikking worden gesteld.

II

Het verdient aanbeveling in navolging van de Commissie voor Beentumoren, commissies in te stellen voor andere tumorgroepen.

III

Onveranderd beenweefsel wordt door osteoclasten niet aangetast.

IV

Histochemisch onderzoek is de betrouwbaarste methode voor de differentiële diagnose tussen tumoren van de blaas en tumoren van de prostaat.

V

De hormoonproductie van de bijnierschors gaat parallel met de activiteit van glucose-6-fosfaatdehydrogenase.

VI

Activiteit van aminopeptidase rond invasief groeiende gezwellen is geen uiting van proteolytische activiteit van deze gezwellen.

VII

De kleurbaarheid van de cellen van de hypophyse-voorkwab geeft slechts onvolledige aanwijzingen over de hormoonproductie van deze cellen.

VIII

Bij het vaststellen van een pH activiteitscurve van een enzym wordt te weinig rekening gehouden met de stabiliteit van het enzym.

IX

Een co-assistent dient gesalariëerd te zijn.

X

In ongevallen- en levensverzekeringen dient men het gebruik van zogenaamde veiligheidsriemen in automobielen verplicht te stellen.

HISTOCHEMISCH ONDERZOEK VAN DE ACTIVITEIT VAN ALKALISCHE EN ZURE FOSFATASE IN NORMAAL EN IN PATHOLOGISCH VERANDERD MENSELIJK WEEFSEL

With a summary

HISTOCHEMISCH ONDERZOEK VAN DE ACTIVITEIT VAN ALKALISCHE EN ZURE FOSFATASE IN NORMAAL EN IN PATHOLOGISCH VERANDERD MENSELIJK WEEFSEL

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE GENEESKUNDE AAN DE RIJKSUNIVERSITEIT TE LEIDEN, OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS MR J. V. RIJPPERDA WIERDSMA, HOOGLERAAR IN DE FACULTEIT DER RECHTSGELEERDHEID, PUBLIEK TE VERDEDIGEN OP WOENSDAG 26 OKTOBER 1960 TE 15 UUR

DOOR

ROELOF GIJSBERT JOHANNES WILLIGHAGEN
GEBOREN TE 's-GRAVENHAGE IN 1922

DRUKKERIJ „LUCTOR ET EMERGO", — LEIDEN

PROMOTOR: PROFESSOR DR. TH. G. VAN RIJSSEL

Dit proefschrift werd bewerkt in het Pathologisch Laboratorium der
Rijksuniversiteit te Leiden

INHOUD

HOOFDSTUK I *Inleiding* 1
Doelstelling van het onderzoek 2
Indeling 3

HOOFDSTUK II *Literatuuroverzicht* 5
Biochemische en klinische aspecten 5
Histochemie van alkalische fosfatase 7
Histochemie van zure fosfatase 11
Histochemische methoden om fosfatasen aan te tonen 12

HOOFDSTUK IIIa *Alkalische fosfatase* 17
Inleiding 17
Algemene regels voor de localisatie 18
Ontstekingsprocessen 19
acute ontsteking 19, chronische ontsteking 20, wondgenezing 20
De activiteit van alkalische fosfatase en celfunctie 22
fibroblasten 22, endometrium 23, nierfunctie 22, muizeovaria 26
Algemene beschouwingen over de mogelijke betekenis van alkalische fosfatase 27
familiaire hypofosfatasaemie 27, fosfolipiden 28

HOOFDSTUK IIIb *Systematische beschrijving van de activiteit van alkalische fosfatase in normale omstandigheden* 29

HOOFDSTUK IIIc *Systematische beschrijving van de activiteit van alkalische fosfatase in pathologische omstandigheden* 38

HOOFDSTUK IVa *Zure fosfatase* 43
Inleiding 43
Algemene regels voor de localisatie 43
De activiteit van zure fosfatase en stapelprocessen 45
reticulo-histioendotheliale systeem, macrofagen, reuzencellen 45, stapelexperimenten met dextraan 46, histochemische reactie op dextraan 47, bespreking van de experimenten met dextraan 48, experimenten met periston 51, lysosomen 55, „electron dense bodies" 57
De activiteit van zure fosfatase en celfunctie 58
Zure fosfatase als identificatiekenmerk 59

HOOFDSTUK IVb *Systematische beschrijving van de activiteit van zure fosfatase in normale omstandigheden* 60

HOOFDSTUK IVc *Systematische beschrijving van de activiteit van zure fosfatase in pathologische omstandigheden* 67

HOOFDSTUK Va *Alkalische en zure fosfatase in gezwelweefsel* 72
Inleiding 72
Gebruik van het enzympatroon bij de diagnostiek 74
metastasen, recidieven 74, alkalische fosfatase 75, zure fosfatase 75, lymforeticulaire maligniteit 79
Verband tussen enzymactiviteit en differentiatiegraad 80
bindweefselgezwellen 81, colontumoren 82
Betekenis van histochemisch onderzoek voor de biochemie 83

HOOFDSTUK Vb *Systematische beschrijving van alkalische en zure fosfatase in gezwellen* 85

HOOFDSTUK VI *Beschrijving van de gebruikte histochemische methoden* 108

SAMENVATTING EN SLOTBESCHOUWING 120

SUMMARY AND CONCLUSIONS 126

LITERATUUR 131

ILLUSTRATIES ..... Ingevouwen in de kaft

HOOFDSTUK I

INLEIDING

Microscopisch onderzoek is sedert Virchow een van de belangrijkste pijlers van de pathologie. De laatste jaren is het mogelijk geworden door histochemisch onderzoek de studie van de zichtbare elementen in weefsels en cellen aan te vullen met gegevens over hun chemische eigenschappen.

Dit histochemisch onderzoek bestudeert dus de localisatie van chemische bestanddelen in weefsels en cellen. Hiermee wordt het werk voortgezet, dat histologen in het midden van de 19de eeuw begonnen. Men trachtte toen met empirische methoden deze bestanddelen aan te tonen. Een voorbeeld van deze werkwijze is de azocarmijnmethode van Best voor glycogeen (het mechanisme van deze kleuring is heden nog niet bekend!). Tevens beschikte men reeds over methoden, die zeer specifiek waren en waarvan het reactiemechanisme bekend was. Een voorbeeld van een dergelijke reactie is de ijzer-kleuring met geelbloedloogzout.

De grote vooruitgang van de laatste 20 jaar van de histochemie is te danken aan biochemici. De behoefte om biochemische vondsten te correleren met morphologische veranderingen heeft via micro- en ultramicromethoden geleid tot nieuwe histochemische methoden. Deze nieuwe histochemische methoden zijn veelal gesteund door modelproeven, ontwikkeld in analogie met macrochemische methoden.

Voorbeelden hiervan zijn de Feulgen-reactie voor desoxyribonucleinezuren, de perjoodzuur Schiff-reactie voor koolhydraten, en verschillende enzymtechnieken. Pogingen om in weefselcoupes, zoals deze voor microscopisch onderzoek gemaakt worden, enzymen aan te tonen en te localiseren, werden in sommige gevallen met succes bekroond.

Zo gaf Gomori in 1939 en 1941 methoden aan om in paraffinecoupes van weefsel niet specifieke fosfo-mono-esterasen, — alkalische en zure fosfatase —

te localiseren. Sindsdien zijn deze methoden gewijzigd naar aanleiding van analyses over betrouwbaarheid en specifiteit, al is het principe gelijk gebleven. Hierdoor beschikt men thans over methoden, waarmee reproduceerbare gegevens zijn te verkrijgen omtrent de localisatie van deze fosfatasen in weefsels en cellen. Het histochemisch onderzoek van enzymen geeft statistische gegevens omtrent de aanwezigheid en de plaats ervan in de weefsels. Tevens komt ten gevolge van veranderingen en verschuivingen in fysiologische, pathologische en experimentele omstandigheden ook de dynamiek van de levensprocessen tot uiting.

Doelstelling van het onderzoek

Toen wij in 1954 begonnen met een systematisch histochemisch enzymonderzoek van menselijke organen stond ons reeds een uitgebreide literatuur ter beschikking over de histochemische activiteit van alkalische fosfatase in normale, experimentele en pathologische omstandigheden. In mindere mate was dit eveneens het geval voor zure fosfatase. Het was echter niet goed mogelijk om de resultaten uit de literatuur onderling te vergelijken, daar de verschillende onderzoekers niet steeds dezelfde methoden hadden gebruikt. De meeste onderzoekers hadden bovendien de activiteit van alkalische- en zure fosfatase bijna uitsluitend onderzocht in weefsel, dat afkomstig was van proefdieren. In de waarnemingen omtrent de activiteit van beide enzymen in menselijk weefsel waren derhalve talrijke hiaten.

Wij wilden met ons onderzoek een overzicht verkrijgen over de activiteit van beide enzymen in normale en pathologische omstandigheden.

Bovendien hadden wij de hoop nadere gegevens te verkrijgen omtrent de functie van deze enzymen in het menselijk organisme.

Toen wij het onderzoek aanvingen, hoopten wij verandering te vinden in de activiteit van deze enzymen bij pathologische processen reeds vóór er bij microscopisch onderzoek morfologische veranderingen te zien waren. In de loop van het onderzoek werden wij — eigenlijk vanzelfsprekend — in dit opzicht vaak teleurgesteld. Wel namen wij talrijke veranderingen in enzymactiviteit waar, die parallel liepen met morfologische veranderingen en tevens zagen wij een karakteristieke verdeling van de activiteit van de beide onderzochte enzymen bij talrijke pathologische processen. Ons streven was hierna gericht op het zoeken van mogelijkheden om deze veranderingen en karakteristieke verdelingen van enzymactiviteiten toe te passen in de pathologie, en in het bijzonder bij de diagnostiek. Er zijn immers verscheidene pathologische

veranderingen, waarbij zelfs na uitgebreid en langdurig morfologisch onderzoek nog twijfel blijft bestaan over de aard van de afwijking. Mogelijk kunnen veranderingen in de activiteit van alkalische en zure fosfatase in deze gevallen meer zekerheid geven.

In het bijzonder hoopten wij gegevens te verkrijgen omtrent de volgende punten:

A. Vaak wenst men inlichtingen over de functietoestand van een bepaald orgaan. Men mag verwachten, dat met behulp van histochemische enzymmethoden hierover inlichtingen zijn te verkrijgen.

B. Een belangrijk probleem vormt vaak de identificatie van cellen. Indien een bepaald celtype gekenmerkt wordt door de activiteit van een bepaald enzym, zal het mogelijk zijn om deze cellen op grond van hun enzymactiviteit te identificeren.

C. Ondanks de grote morfologische kennis van gezwellen zijn er steeds nog gevallen, waarbij de differentiële diagnostiek moeilijkheden biedt. De verschillen in de activiteiten van enzymen in gezwellen hopen wij te kunnen gebruiken bij de diagnostiek van gezwellen. Bovendien zou men kunnen trachten verschillen in enzymactiviteit, die bestaan bij verschillende gevallen van éénzelfde gezweltype, in verband te brengen met de gradering van deze gezwellen.

Indeling

In hoofdstuk II wordt een overzicht gegeven van de betekenis van de alkalische en zure fosfatase, zoals deze door verschillende onderzoekers wordt gezien.

In de volgende hoofdstukken (III, IV, V) worden de resultaten van ons onderzoek medegedeeld.

In hoofdstuk III wordt de activiteit van alkalische fosfatase in normaal en pathologisch veranderd weefsel besproken. In dit hoofdstuk ligt de nadruk op de veranderingen van de activiteit van alkalische fosfatase in pathologische omstandigheden. Wij zullen ons hierbij aan enige speculaties wagen over de mogelijke betekenis van alkalische fosfatase in het organisme.

In hoofdstuk IV wordt de activiteit van zure fosfatase in normale en pathologische omstandigheden besproken. De nadruk ligt hierbij op de experimenten, die gedaan werden, om de biologische betekenis van dit enzym te onderzoeken.

In hoofdstuk V wordt de betekenis van alkalische en zure fosfatase in gezwelweefsel besproken. De nadruk ligt hierbij geheel op de diagnostische mogelijkheden van het onderzoek naar enzymactiviteiten in gezwellen.

In deze drie laatste hoofdstukken zijn beschouwingen en waarnemingen gescheiden gehouden. De systematische beschrijvingen van de waarnemingen zijn in kleine letter aan het einde van deze hoofdstukken te vinden.

Bij de systematische beschrijving van de activiteiten van de enzymen alkalische en zure fosfatase in normaal en pathologisch veranderd weefsel, werd voor de organen steeds eenzelfde volgorde aangehouden. Deze volgorde is dezelfde als die welke in het Pathologisch Laboratorium wordt gebruikt bij de codering van de diagnosen. Achterin dit proefschrift zijn de illustraties ingevouwen in de kaft. Aan het eind hiervan is de coderingslijst afgedrukt, zodat deze geraadpleegd kan worden om de plaats te vinden waar een bepaald orgaan besproken wordt in die hoofdstukken, waarin deze volgorde van organen wordt gebruikt.

In hoofdstuk VI worden de gebruikte histochemische methoden uitvoerig beschreven.

HOOFDSTUK II

LITERATUUROVERZICHT

Biochemische en klinische aspecten

Als inleiding op de bespreking van de histochemische methoden voor alkalische- en zure fosfatase dienen enkele biochemische en klinisch-chemische aspecten van deze enzymen in het kort te worden vermeld.

Alkalische fosfatase en zure fosfatase zijn enzymen, dat wil zeggen eiwitten, die het vermogen bezitten bepaalde chemische reacties katalytisch te versnellen. Enzymen worden in het algemeen genoemd naar de verbinding (substraat), waarop ze werken, door aan de naam van het substraat, de uitgang -ase toe te voegen. De enzymen alkalische- en zure fosfatase behoren tot de groep van de hydrolytische enzymen. Dit zijn enzymen, die met medewerking van watermoleculen, in staat zijn verbindingen van alcoholen of phenolen met organische of anorganische zuren te splitsen of onder sommige omstandigheden op te bouwen.

De fosfatasen hebben in het bijzonder het vermogen de splitsing van fosforzure esters te katalyseren. Er blijken een aantal verschillende fosfatasen te bestaan. Sommige fosfatasen werken specifiek op één of op een kleine groep van substraten, zoals het glucose-6-fosfatase, dat slechts werkt op één enkel substraat, het glucose-6-fosfaat.

Daarnaast zijn er ook fosfatasen, die werken op substraten, die een bepaalde binding in hun molecuul bezitten. Alkalische- en zure fosfatasen behoren tot deze groep. Ze katalyseren namelijk de splitsing van alle mono-esters van orthofosforzuur.

De alkalische fosfatase, waarvan de volledige naam alkalische fosfo-mono-esterase is, heeft een optimale werking bij pH 8.6—9.4. De zure fosfatase, waarvan de volledige naam zure fosfo-mono-esterase is, heeft een optimale

werking bij pH 5.0—5.5. Behalve door een verschillend pH optimum, onderscheiden beide enzymen zich door hun verschillende gevoeligheid voor temperatuursverhoging en voor andere fysische invloeden [1]). Voor beide enzymen is bovendien het activerings- en het inactiveringspatroon verschillend. Alkalische fosfatase wordt bijvoorbeeld geactiveerd door Mg++ ionen, het wordt geremd door verbindingen met SH groepen en heeft een optimale stabiliteit in het pH gebied van 7.5—8.5. Zure fosfatase wordt niet geactiveerd door Mg++ ionen, het wordt geremd door fluoride en heeft een optimale stabiliteit in het pH gebied van 5.0—6.0. Op grond van hun biochemische kenmerken is het dus zeker, dat men met twee verschillende enzymen te maken heeft.

Het is zeer waarschijnlijk, dat er niet één alkalische en één zure fosfatase bestaat, doch dat van beide enzymen meerdere typen aanwezig zijn in de weefsels. In normaal menselijk serum kan men bijvoorbeeld de zure fosfatase slechts ten dele remmen met tartraat (Fishman, 1953). Het deel van de zure fosfatase in het serum, dat door tartraat geremd wordt, blijkt afkomstig te zijn uit de prostaat.

De zure fosfatase, die in erythrocyten aanwezig is, wordt reeds door een zeer lage concentratie van koperionen geremd (Reynolds c.s. 1956).

In de kliniek gebruikt men de bepaling van de activiteit van alkalische- en zure fosfatase in het serum reeds een dertigtal jaren als hulpmiddel bij de diagnostiek.

De activiteit van alkalische fosfatase in het serum is verhoogd bij alle processen, waarbij men mag aannemen, dat de osteoblasten meer dan normaal actief zijn. Onder fysiologische omstandigheden is dit het geval bij kinderen gedurende de groeiperiode, onder pathologische omstandigheden is dit het geval bij osteoplastische processen zoals bijvoorbeeld bij patiënten met bottumoren. Men vindt ook een verhoogde activiteit in het serum bij patiënten met gezwelmetastasen in het skelet, tijdens bepaalde fasen van de ziekte van Paget en van rachitis. Bij al deze processen veronderstelt men een versterkte overgang van alkalische fosfatase uit de osteoblasten naar de bloedbaan.

Dat de alkalische fosfatase in het serum uit de osteoblasten afkomstig is, kon ook op andere wijze waarschijnlijk gemaakt worden. Cohn c.s. (1953) bestraalde de pijpbeenderen van ratten met röntgenstralen. De meeste osteo-

---

[1]) Een overzicht over de fosfatasen geeft J. Roche in: „The Enzymes" onder redactie van Sumner en Myrbäck. Academic Press Inc. New York, 1950. I.1: 473-510.
Zie ook het proefschrift van Neumann (1949) Phosphatasen.

blasten worden dan vernietigd en de alkalische fosfatase activiteit in het serum daalt.

In de lever vindt een proces plaats waarbij de alkalische fosfatase uit het bloed wordt verwijderd en vervolgens met de gal wordt uitgescheiden. Bij belemmering van deze verwijdering door diffuse of locale processen in de lever of van de uitscheiding van de gal door afsluiting van de galwegen, stijgt de activiteit van alkalische fosfatase in het serum eveneens.

De activiteit van zure fosfatase in het serum is meestal verhoogd bij lijders aan carcinoom van de prostaat, al dan niet met metastasen. Deze verhoging betreft dan de met behulp van tartraat te remmen fractie.

Alkalische- en zure fosfatase zijn dus klinisch-chemisch van belang. Toch was de rol in het celmetabolisme van beide fosfatasen nog niet duidelijk geworden. Toen men door biochemisch onderzoek een hoge activiteit van alkalische fosfatase vond in verkalkend bot, stelde Robison de hypothese op, dat in dit beenweefsel fosforzure esters door activiteit van alkalische fosfatase gesplitst zouden worden. Hierdoor zou dan, tezamen met het aanwezige calcium uit de intercellulaire vloeistof, het oplosbaarheidsproduct van calciumfosfaat worden overschreden en calciumfosfaat zou ter plaatse in de grondsubstantie worden neergeslagen (Robison 1923, Roche 1946, 1950).

Om een betere indruk te krijgen van de betekenis van deze enzymen heeft men naar mogelijkheden gezocht om de activiteit van deze enzymen in weefselcoupes aan te tonen.

Reeds in 1923 is een poging gedaan door Robison, om in weefselcoupes histochemisch alkalische fosfatase te localiseren. Zijn methode was echter nog gebrekkig en vond weinig of geen toepassing.

In 1939 beschreven Gomori en Takamatsu, onafhankelijk van elkaar, methoden om in weefselcoupes de activiteit van alkalische fosfatase te localiseren. In 1941 beschreef Gomori een methode om zure fosfatase histochemisch aan te tonen.

Histochemie van alkalische fosfatase

Bij histochemisch onderzoek van de activiteit van alkalische fosfatase bij verbeningsprocessen is gebleken, dat bij verbening een toeneming van de enzymactiviteit in bepaalde cellen aan de kalkafzetting voorafgaat.

Osteoblasten hebben steeds een zeer sterke activiteit van alkalische fosfatase. Als osteoblasten tot osteocyten worden, blijft deze enzymactiviteit

behouden, zolang de osteocyten in de buitenste lagen van de botbalkjes liggen. Ook de cellen van het periost hebben, zolang ze bij de periostale verbening betrokken zijn, sterke activiteit van alkalische fosfatase. Bij de enchondrale beenvorming ontstaat in de kraakbeencellen, die in de epiphysair-schijf zwellen, en in de kraakbeentussenstof activiteit van alkalische fosfatase. Bij desmale verbening ontwikkelt zich een activiteit van alkalische fosfatase in bepaalde gebieden, waar later bot wordt gevormd. In beentumoren is er eveneens steeds activiteit van alkalische fosfatase in osteoblastische gebieden (Schajowicz en Cabrini, 1955).

Dat alkalische fosfatase betekenis heeft bij het proces van beenvorming lijkt dus uit de histochemische localisatie wel zeer waarschijnlijk. Het lijkt aannemelijk, dat de alkalische fosfatase in het serum bijna uitsluitend afkomstig is uit de beenderen.

Groeiende kinderen hebben een hogere alkalische fosfatase activiteit in het serum dan volwassenen. Tijdens osteoplastische processen, zoals bij patiënten lijdend aan de ziekte van Paget, bij patiënten met osteoplastische gezwelmetastasen, is de activiteit van alkalische fosfatase in het serum verhoogd.

Dat de alkalische fosfatase in het serum uit de osteoblasten afkomstig is, blijkt eveneens uit de bovengenoemde experimenten van Cohn c.s. (1953).

Uit immunochemische onderzoekingen van Schlamowitz (1958) blijkt eveneens, dat de alkalische fosfatase in het serum bijna uitsluitend afkomstig is uit de beenderen. Hij zuiverde het enzym uit beenderen, darm, nier en lever. Met de gezuiverde enzympreparaten werden antilichamen opgewekt bij konijnen. Deze antilichamen konden gebruikt worden om de specifieke fosfatasen te precipiteren.

Een uitvoerig overzicht van de literatuur over de betekenis van alkalische fosfatase bij de beenvorming geeft Bourne (1956). Dat de werking van alkalische fosfatase een rol speelt bij de beenvorming is duidelijk. De meningen verschillen over de vraag in welke fase van de beenvorming de alkalische fosfatase een rol speelt. De opvattingen hierover hebben zich in de loop van de laatste twintig jaren als volgt ontwikkeld: Bourne (1956):

1. Het enzym is betrokken bij de vorming van fosfaationen, waardoor calcium als beenzout kan worden neergeslagen.
2. Het enzym is betrokken bij de vorming van de organische matrix van het bot.
3. Het enzym regelt de vorming van fosfaatesters, die een matrijs vormen voor de kristallisatie van beenzouten.

4. Het enzym houdt het oppervlak van de kristallen in het bot vrij van fosfaatesters, zodat op deze wijze een voortdurende groei van de beenkristallen mogelijk blijft.

Welke van deze mogelijkheden juist is, ontgaat ons vooralsnog. Dat alkalische fosfatase een rol speelt bij het neerslaan van calciumzouten zoals Robison (1923) veronderstelde, is echter niet waarschijnlijk. De belangrijkste argumenten, die hiertegen worden aangevoerd zijn:

1. In tal van organen is alkalische fosfatase aanwezig, in darm en nier bijvoorbeeld zeer veel, zonder dat verkalking optreedt.
2. Indien beenstukjes, die ontkalkt zijn op een zodanige wijze, dat de enzymen geïnactiveerd zijn, in een oplossing van anorganische zouten gebracht worden, treedt in vitro verkalking op. De afzetting van beenzouten, vindt dan plaats op dezelfde wijze als in vivo. Organische fosfaatverbindingen spelen daarbij geen rol.

Nadat Gomori in 1939 de histochemische methode voor alkalische fosfatase beschreven had, verschenen er weldra enkele overzichten over de normale localisatie van dit enzym (Gomori 1941, Kabat en Furth 1941, Bourne 1944). In de daaropvolgende jaren zijn er vele afzonderlijke bijdragen verschenen over de localisatie van alkalische fosfatase in weefsels van mens en dier onder normale, pathologische en experimentele omstandigheden. Zoals reeds in de inleiding vermeld werd, werkten de verschillende onderzoekers echter niet allen volgens dezelfde methode, zodat de resultaten niet steeds vergelijkbaar zijn. Toch werd het duidelijk, dat het enzym ook nog een andere fysiologische betekenis in het organisme moest hebben dan alleen bij het verbeningsproces. De localisatie in de borstelzoom van het epitheel van dunne darm en niertubuli, werd in verband gebracht met resorptie van voedingsbestanddelen. Omdat fosforylering en defosforylering een belangrijke plaats innemen bij de koolhydraat stofwisseling, veronderstelde men, dat alkalische fosfatase bij de glucose-resorptie in de tubuli contorti een functie zou vervullen. Experimenten van Kritzler (1941) met phloridzine konden dit niet bevestigen. Marsh (1946) meende echter wel een invloed van phloridzine op de activiteit van alkalische fosfatase waar te nemen.

Danielli (1946) veronderstelde, eveneens op grond van de localisatie van het enzym in grensvlakken van diverse epithelia en in capillairen, dat het enzym een rol speelt bij de resorptie. Hij zag verder alkalische fosfatase in het fibreuze weefsel bij wondgenezing, waar retractie plaats vindt en ook bij

celdelingen in de protoplasmadraadjes, die van de centriolen naar de uitwijkende chromosomen lopen. Op grond hiervan dacht hij, dat het enzym in analogie met het ATP-ase bij de spiercontractie, mogelijk andere contractiele eiwitten tot contractie kan brengen.

Hij zag een analogie tussen de retractie van bindweefsel bij de wondgenezing, de retractie bij het uiteengaan van de chromosomen en het opnemen van stofwisselingsproducten op grensvlakken. In al deze gevallen zouden contractiele eiwitten een rol kunnen spelen. Wat de resorptie betreft, stelde hij zich voor, dat het contractiele eiwit specifiek zou zijn voor de te resorberen stof. De specifieke groep ligt buiten het celoppervlak, de te resorberen groepen worden gebonden. Onder invloed van alkalische fosfatase zou energie worden vrijgemaakt, waardoor het eiwit kan contraheren en het materiaal door de celmembraan heen in het protoplasma wordt gebracht. Hier vindt dan verdere verwerking plaats en het eiwit ontspant weer en de specifieke groep komt weer in of buiten het celoppervlak. Deze gedachtengang steunt echter op geen enkel experimenteel bewijs.

Moog (1952) beschrijft, dat zij activiteit van alkalische fosfatase steeds vindt, waar met de perjoodzuur-Schiff-kleuring polysacchariden aangetoond worden. Zij veronderstelt, dat alkalische fosfatase gebonden is aan een glycoproteide en op deze wijze verankerd is in de celstructuren. Ook in ons materiaal is deze paralleliteit vaak aanwezig, soms zijn echter de hoeveelheid perjoodzuur-Schiff-positieve polysacchariden zeer gering; deels ontbreken ze geheel.

In de borstelzoom van nier en darm is op dezelfde plaats als de activiteitt van alkalische fosfatase een met de perjoodzuur-Schiff-reactie (PAS-reactie) kleurbaar koolhydraat aanwezig. Maar in andere cellen met sterke activiteit van alkalische fosfatase, zoals de cellen van de bijnierschors en de alveolaire epitheelcellen in de long, ontbreekt het PAS-positieve materiaal geheel.

Andere onderzoekers trekken conclusies uit het feit, dat in sommige cellen met activiteit van alkalische fosfatase ook andere prototplasma bestanddelen rijkelijk aanwezig zijn, zoals bijvoorbeeld glycogeen (Arzac, 1948). Zij menen dan, dat het enzym in verband staat met de synthese of de afbraak van deze in het cytoplasma in wisselende hoeveelheden voorkomende substanties.

Bij de intermediaire stofwisseling is echter een zeer groot aantal enzymen betrokken en ontstaan talrijke intermediaire producten.

Als men hieruit met het geringe aantal ter beschikking staande histochemische methoden enkele bestanddelen licht en dan op enkele plaatsen een

gelijktijdig voorkomen ziet, *is het voorbarig hier conclusies aan te verbinden.*

Op deze wijze zou men activiteit van alkalische fosfatase met de verwerking van de meeste histochemisch aantoonbare protoplasma bestanddelen in verband kunnen brengen.

Histochemie van zure fosfatase

In hetzelfde jaar, dat Gomori de methode beschreef om de activiteit van zure fosfatase histochemisch te onderzoeken, liet hij een samenvatting volgen over de localisatie van dit enzym in normale weefsels (Gomori 1941). Het aantal publicaties over zure fosfatase is echter aanmerkelijk geringer dan dat over alkalische fosfatase, in het bijzonder wat betreft menselijk weefsel. De oorzaak hiervan is, dat de histochemische methode voor zure fosfatase moeilijker is. Zo hebben vele onderzoekers activiteit van zure fosfatase in kernen gevonden (o.a. Abolins en Abolins 1949), hoewel met differentiële centrifugatie (eveneens een cytochemische methode) blijkt, dat er geen zure fosfatase aanwezig is in de kernfractie, maar wel in de fracties van de mitochondriën en microsomen (de Duve c.s. 1956).

Op grond van de histochemische localisatie van de activiteit van zure fosfatase zijn eveneens hypothesen opgesteld over de betekenis van dit enzym. La Velle c.s (1951) namen waar, dat in motorische ganglioncellen de hoeveelheid ribonucleinezuren in deze cellen daalde bij doorsnijden van de perifere zenuw. De activiteit van zure fosfatase daalde dan eveneens. Hij veronderstelde op grond van deze waarneming een invloed van zure fosfatase op de ribonucleinezuur synthese.

Kroon (1951) veronderstelde naar aanleiding van de waarnemingen van hoge activiteit van zure fosfatase in cellen, waarin veel eiwit gesynthetiseerd wordt, dat zure fosfatase van belang zou zijn voor de eiwitstofwisseling.

Uit onderzoekingen van de Duve c.s. (1956) met differentiële centrifugatie van gehomogeniseerde rattenlevers bleek, dat zure fosfatase tezamen met andere hydrolytische enzymen in een bepaalde fractie van het homogenaat aanwezig was.

Deze fractie bevatte deeltjes, die wat hun grootte betreft, tussen mitochondriën en microsomen inliggen.

De Duve c.s. veronderstelde, dat deze enzymen uit deze deeltjes vrijkomen bij de celdood en dan een rol spelen bij het opruimen van de celbe-

standdelen. Wij komen terug op de onderzoekingen van de Duve in hoofdstuk IV.

Gegevens uit de literatuur, die uitsluitend betrekking hebben op de localisatie van de fosfatasen in bepaalde weefsels en organen, zullen wij vermelden bij de beschrijving van onze eigen waarnemingen hiervan.

Histochemische methoden om fosfatasen aan te tonen

Een eerste vereiste voor een goede histochemische enzymtechniek is, dat een onoplosbaar reactieproduct ontstaat op de plaats van de enzymwerking.

Een tweede eis is, dat dit reactiepunt òf direct zichtbaar is, òf zichtbaar is te maken. De voorafgaande bewerking van het weefsel dient erop gericht te zijn het enzym niet, of zo min mogelijk, te inactiveren.

Tevens moet diffusie van het enzym of van de reactieproducten zoveel mogelijk worden tegengegaan.

Wat betreft de fosfatasen, kan aan de eerste eis, dat als gevolg van de enzymwerking een onoplosbaar reactieproduct moet worden gevormd op de plaats van de werking van het enzym, worden voldaan, doordat men de omstandigheden zo kiest, dat de door enzymwerking van het substraat afgesplitste fosfaationen als onoplosbaar fosfaat wordt neergeslagen.

Bij de methode voor alkalische fosfatase, worden de afgesplitste fosfaationen gevangen als calciumfosfaat. De substraatoplossing bevat daarom, behalve de buffer, een calciumzout. Het gevormde calciumfosfaat wordt zichtbaar gemaakt door de coupes eerst in een cobaltzoutoplossing te brengen, waarin het het cobaltion het calciumion vervangt. Vervolgens brengt men de coupes in een sulfideoplossing. Het cobaltfosfaat gaat dan over in zwart cobaltsulfide.

Bij de methode voor zure fosfatase, worden de fosfaationen neergeslagen als loodfosfaat. De substraatoplossing bevat daarom, behalve de buffer, een loodzout. Als men de coupes vervolgens in een sulfideoplossing brengt, ontstaat zwartbruin loodsulfide.

De keus van calcium, resp. lood wordt bepaald door de onoplosbaarheid van calcium- en loodfosfaat in het pH gebied waarbij de fosfatasen werken.

Aan de tweede eis, het zichtbaar maken van het reactieproduct, is tevens voldaan. Bij beide methoden wordt uiteindelijk een gekleurd sulfide gevormd op de plaats van de enzymactiviteit.

De invloed van de fixatie en het impregneren van de weefselstukjes met paraffine op de enzymactiviteit is ten dele reeds door Gomori (1939)

onderzocht. Later zijn door verscheidene onderzoekers uitvoeriger mededelingen over de schadelijke invloed van fixatiemiddelen, van ontwateringsmiddelen en van de verwarming tijdens het impregneren met paraffine gedaan (Danielli 1946, Ruyter 1949, Cleland 1950, Richterich 1952).

Men is genoodzaakt om te fixeren, daar anders de localisatie van de enzymactiviteit onbetrouwbaar is. Slechts een deel van de enzymen is namelijk aan de structuur van de cel gebonden en vrij moeilijk daarvan los te maken; men noemt dit desmo-enzymen. Een ander deel — de lyo-enzymen — is niet aan de celstructuur gebonden en diffundeert daardoor gemakkelijk in het ongefixeerde weefsel en in de incubatievloeistof. Nachlas c.s. (1956) deed een onderzoek naar de verhouding van lyo- en desmo-enzymen voor een aantal hydrolytische enzymen. Van alkalische fosfatase is tweederde deel als desmoenzym aan de celstructuur gebonden, van zure fosfatase blijkt slechts de helft desmo-enzym te zijn.

Gomori (1939) fixeerde het weefsel, waarin hij alkalische fosfatase wilde aantonen in 95% alcohol, die gekoeld was tot 4° C. Voor zure fosfatase bleek alcohol als fixatiemiddel ongeschikt. Het bleek (Gomori 1941), dat voor fixatie van dit enzym aceton, eveneens gekoeld tot 4° C beter geschikt was. Daar alkalische fosfatase acetonfixatie goed verdraagt, (Danielli 1946) is ons materiaal, waarin beide enzymen naast elkaar werden onderzocht in aceton gefixeerd bij ± 4° C. Het inbedden in paraffine, waarbij de enzymen aan betrekkelijk hoge temperatuur worden blootgesteld, geeft bij de histochemische methoden voor alkalische- en zure fosfatase aanzienlijk verlies van activiteit. Verschillende onderzoekers (Danielli 1946, Berenbom c.s. 1952) bepaalden met biochemische methoden de enzymactiviteit in weefselstukjes vóór en nadat deze in paraffine waren ingebed. Zij deden dit door na de paraffine inbedding de blokjes te homogeniseren en in de extracten de enzymactiviteit te bepalen. Deze onderzoekers vonden, dat afhankelijk van de tijdsduur van de paraffine-inbedding 60—80% van de alkalische fosfatase en 70—90% van de zure fosfatase geïnactiveerd wordt. Ook bij ons onderzoek bleek, dat bekorting van de duur van de verwarming het verlies van activiteit vermindert. Door de te onderzoeken weefselstukjes zo dun mogelijk te maken, kan de tijdsduur van het inbedden bekort worden, daar dan in kortere tijd het gehele weefselstukje geïmpregneerd is. Het impregneren wordt bovendien in een vacuum gedaan, waardoor deze schadelijke periode tot 15 à 30 minuten kan worden bekort. Tevens gebruiken wij paraffine met een laag smeltpunt, namelijk met een smelttraject van 56°—58° C, zodat de temperatuur tijdens het inbedden nooit boven 60° C komt.

Men kan de verwarming, waardoor een zo'n belangrijke inactivering van de enzymen wordt veroorzaakt, echter vermijden door de enzymreactie te doen op vriescoupes.

Het is gebleken, dat indien men weefselstukjes gedurende 24 uur fixeert in neutrale formaline van 4° C en daarna vriescoupes maakt de enzymactiviteit grotendeels behouden blijft.

Een andere mogelijkheid is, de enzymreacties te doen op vriescoupes van ongefixeerd weefsel. Voor dit doel kan men gebruik maken van een vriesmicrotoom met gekoeld mes, eenvoudiger kan men vaak vriescoupes van ongefixeerd weefsel maken in een voor dit doel geconstrueerde cryostaat (Willighagen 1959). Een voordeel van het gebruik van coupes van ongefixeerd weefsel is bovendien, dat het mogelijk is in deze coupes de activiteit van enzymen te onderzoeken, die niet bestand zijn tegen fixatie. Voor de reacties op alkalische- en zure fosfatase worden deze coupes gefixeerd, daar anders diffusie van het enzym in de coupe en de incubatievloeistof plaats vindt.

De factoren, die van invloed zijn op de diffusie van het enzym in de coupe, namelijk de fixatie, de wijze van deparaffineren, de concentraties van de bestanddelen in de substraatoplossing, zijn vooral voor alkalische fosfatase uitvoerig onderzocht (Danielli 1946; Cleland 1950; Leduc en Dempey 1951; Feigin en Wolf 1953; Barter 1955; Johansen en Linderstrøm-Lang 1952).

De door ons gevolgde werkwijze, die steunt op deze literatuurgegevens, wordt in hoofdstuk VI uitvoeriger beschreven. Deze werkwijze komt in principe overeen met de later door Gomori (1951) aangegeven wijzigingen van zijn oorspronkelijke methoden.

Deze verbeterde methoden van Gomori zijn gevoelig, met eenvoudige middelen uit te voeren en gemakkelijk toe te passen op grote aantallen coupes tegelijk. Daarom hebben wij, toen in 1954 begonnen werd met het onderzoek van menselijk materiaal, deze methode verkozen boven andere. De ontwikkeling van de histochemie heeft echter de laatste jaren, ook wat betreft de methoden voor alkalische- en zure fosfatase, niet stil gestaan en ook met behulp van methoden, gebaseerd op andere histochemische principes kunnen alkalische- en zure fosfatase in cellen worden aangetoond. Wij hebben deze nieuwe methoden de laatste jaren eveneens toegepast. Principieel afwijkende beelden hebben wij niet gevonden, zodat wij de methoden van Gomori zijn blijven gebruiken. Bovendien bleef het hierdoor mogelijk de resultaten uit verschillende perioden van ons onderzoek onderling te vergelijken.

Zoals reeds is vermeld, wordt bij de methoden van Gomori om alkalische- en zure fosfatase in weefselcoupes aan te tonen het fosfaation aangetoond. Het principe van een andere methode, die ook voor andere hydrolitische enzymen wordt gebruikt, is aangegeven door Menten c.s. (1944). Als substraat wordt gebruikt de fosforzure ester van naphtol. Zowel α als β naphtylfosfaat worden gebruikt. Het door de enzymwerking vrij gemaakte naphtol reageert daarna met een eveneens in de substraatoplossing aanwezig diazoniumzout. Daardoor wordt op de plaats van enzymactiviteit een onoplosbaar gekleurd reactieproduct gevormd. Deze methode werd nadien verbeterd door Manheimer en Seligman (1948), Grogg en Pearse (1952). Deze methode is minder gevoelig dan de methode van Gomori. De localisatie is vaak door diffusie minder goed te beoordelen. Een moeilijkheid is vooral ook om een diazoniumzout te vinden, dat bij de pH waarbij het enzym optimaal werkt, snel genoeg met het naphtol reageert om ter plaatse een onoplosbare verbinding te vormen.

Rutenburg c.s. (1955) ontwikkelden daarom een methode, waarbij als substraat wordt aangeboden 6 benzoyl-naphtol fosfaat. Het 6 benzoyl-naphtol is onoplosbaar in water en blijft op de plaats van de enzymwerking liggen. Nadat de reactie heeft plaats gevonden worden de coupes in een oplossing van een diazoniumverbinding geplaatst. Bij pH 8 reageert het gebruikte diazoniumzout snel met 6 benzyol-naphtol en ontstaat het onoplosbare, gekleurde reactieproduct op de plaats van de enzymwerking. Wij hebben deze methode eveneens toegepast. Onze indruk was, dat ook deze methode minder gevoelig is en er diffusie van het reactieproduct optreedt.

Burstone (1958) heeft methoden uitgewerkt voor alkalische- en zure fosfatasen waarbij als substraat fosforzure esters van naphtol AS-MX, naphtol AS-TR, naphtol AS-CL en naphtol AS-BI gebruikt worden. Deze methoden zijn gevoelig, de localisatie is scherp, terwijl het reactieproduct fraai rood of blauw is.

Tenslotte is het mogelijk gebleken, fosfatasen te localiseren met behulp van een derde principe (Barnett 1951, 1952, Holt 1952, 1954, 1956). Bij toepassing van deze methode wordt indoxylfosfaat als substraat gebruikt. Het door enzymwerking afgesplitste indoxyl wordt op de plaats waar het ontstaat geoxideerd tot een onoplosbare indigo kleurstof. Met deze methode voor fosfatasen hebben wij geen ervaring opgedaan, wel konden wij dit principe gebruiken voor het localiseren van de activiteit van esterasen.

Bij onze onderzoekingen verkregen wij een indruk van de relatieve enzym-

activiteit door visuele vergelijking van de intensiteit van het zwartbruine neerslag na een bepaalde incubatietijd.

Er zijn ook pogingen gedaan om de activiteit van alkalische- en zure fosfatase in de coupe kwantitatief te meten. Barka c.s. (1952) voegde radioactief lood aan de incubatievloeistof toe en bepaalde na uitvoering van de histochemische reactie de radioactiviteit in een klein veld ter grootte van circa 1 mm^2. Doyle (1951) extraheerde het gevormde cobaltsulfide per coupe en bepaalde de hoeveelheid daarvan met een ultramicromethode. Davies c.s. (1954) en Barter c.s. (1955) deden kwantitatieve bepalingen met behulp van een interferentiemicroscoop. Met het interferentiemicroscoop is het mogelijk om de vertraging van de lichtstraal in een object te meten door vergelijking van de door het object (weefselcoupe) vertraagde lichtstraal en een langs het object geleide lichtstraal. Deze vertraging is evenredig met de hoeveelheid droge stof in het object. Men kan dus in weefselcoupes, die in substraatoplossing liggen, de hoeveelheid neergeslagen calciumfosfaat als functie van de tijd bepalen door observatie van de reactie onder het interferentiemicroscoop.

Door het calciumfosfaat weer op te lossen, kan men enkele malen in dezelfde cel, eventueel onder wisselende omstandigheden, de vormingssnelheid van het calciumfosfaat meten en als maat gebruiken voor de activiteit van alkalische fosfatase. Ze onderzochten o.a. de invloed van de pH, de concentratie van het substraat, de invloed van magnesiumionen en de invloed van de temperatuur. Zij vonden o.a., dat slechts 2% van de afgesplitste fosfaationen ontsnapt in de incubatievloeistof. Bovendien konden zij aantonen, dat de activiteit van alkalische fosfatase in kernen minimaal is. De activiteit van alkalische fosfatase in kernen verhoudt zich tot die in de borstelzomen van nier en duodenum als 1 à 5 tot 200 en 1000.

Ook met behulp van het electronenmicroscoop is het gelukt, hoewel zeer gebrekkig, het primaire reactieproduct, dat ontstaat bij de histochemische reactie op alkalische- en zure fosfatase in cellen zichtbaar te maken. Sheldon c.s. (1955) toonde door middel van het electronenmicroscoop het loodfosfaatneerslag, dat ontstaat bij de reactie op zure fosfatase in de borstelzoom van de darm aan.

Brandes c.s. (1956) kon het calciumfosfaat, dat gevormd wordt bij de reactie op alkalische fosfatase in het celoppervlak van algen aantonen.

HOOFDSTUK IIIa

ALKALISCHE FOSFATASE

Inleiding

In dit hoofdstuk worden de aspecten besproken van de activiteit van alkalische fosfatase in normale en pathologische omstandigheden. De nadruk ligt hierbij op onze waarnemingen, bij het onderzoek van menselijk weefsel.

In de eerste plaats worden enige algemene regels gegeven voor de localisatie van de activiteit van alkalische fosfatase in normale omstandigheden. In aansluiting hieraan wordt de activiteit in pathologische omstandigheden besproken. Hierbij komen twee facetten naar voren: de activiteit van alkalische fosfatase bij acute en chronische ontstekingsprocessen en de veranderingen van de activiteit van alkalische fosfatase bij functionele veranderingen van organen. Daarna volgen enkele algemene beschouwingen over de mogelijke betekenis van de activiteit van alkalische fosfatase. De activiteit van alkalische fosfatase in gezwellen wordt afzonderlijk besproken, tezamen met die van zure fosfatase in hoofdstuk V.

Aan hoofdstuk III is een systematische beschrijving van onze waarnemingen toegevoegd: in IIIb wordt de localisatie van de activiteit van alkalische fosfatase in normale menselijke weefsels beschreven en in IIIc de activiteit van dit enzym in pathologische omstandigheden. De localisatie van de activiteit van alkalische fosfatase is bij verschillende zoogdieren niet dezelfde. Er is echter niet naar gestreefd deze verschillen uitvoerig te beschrijven.

Uitsluitend in verband met de bespreking van de betekenis van de activiteit van alkalische fosfatase wordt de activiteit van dit enzym in dierlijk weefsel ter sprake gebracht. In de aanhangsels IIIb en IIIc zijn bij enkele organen opmerkelijke verschillen vermeld om de verschillen tussen de verschillende zoogdiersoorten te onderstrepen.

Algemene regels voor de localisatie

Bij histochemisch onderzoek van de localisatie van de activiteit van alkalische fosfatase blijkt, dat er enige algemene regels zijn op te stellen.

I. Endotheelcellen van capillairen, arteriolae en venulae tot een diameter van plm. 50μ, bevatten meestal alkalische fosfatase (afb. 5, 8a, 8b, 9, 19). Deze activiteit is niet in alle capillairen aanwezig. In normale glomerulus-lissen bijvoorbeeld, is er geen enzym activiteit.
In hart en pancreas is er opvallend sterke alkalische fosfatase activiteit in alle capillairen.
In dwarsgestreepte spier lijkt het alsof slechts in een deel van de capillairen de endotheelcellen alkalische fosfatase bevatten.
In de long is de activiteit van alkalische fosfatase in de endotheelcellen van de capillairen in de wand van de alveoli gering.
In de capillairen in de septa en rond de bronchi daarentegen is duidelijke alkalische fosfatase activiteit waar te nemen.
De fysiologische functie van de capillairen in de verschillende organen is niet dezelfde. In de capillairen in de wand van de alveoli vindt voornamelijk gasuitwisseling plaats, in de capillairen in de glomeruli vindt een passieve filtratie van het bloed plaats. Het is uit onderzoek met het electronenmicroscoop bekend, dat de submicroscopische bouw van de capillairen verschillend is. Het verschil in alkalische fosfatase activiteit in verschillende organen heeft dus mogelijk een functionele betekenis. Welke deze betekenis is, ontgaat ons vooralsnog.
Van deze capillaire endotheel activiteit is gebruik gemaakt om in dikke weefselstukjes (100-200 μ) het vaatverloop te bestuderen (Landow c.s., 1942). Zo kan men bijvoorbeeld in dikke coupes van het maagslijmvlies zichtbaar maken, hoe de capillairen in de lengte om de klierbuisjes gerangschikt liggen.

II. Wanneer alkalische fosfatase in epitheelcellen aanwezig is, ziet men de sterkste activiteit vaak in het apicale deel van de cel (afb. 3). In het epitheel van de dunne darm en in dat van de tubuli contorti van de nier, is de activiteit het sterkst in de borstelzoom.
Ook in het epitheel van trachea, bronchi, tubae en endometrium is de enzymactiviteit apicaal het grootst.

Er zijn dus twee zeer typische localisaties: die in endotheelcellen en apicaal in naar lumina gerichte epitheelcellen.

Enzymactiviteit wordt echter ook in het protoplasma van diverse andere celtypen aangetroffen. Deze localisaties worden aan het eind van dit hoofdstuk uitvoeriger beschreven (IIIb en IIIc).

Ontstekingsprocessen

Acute ontsteking is gekenmerkt door een overwegend uit polynucleaire leucocyten bestaand infiltraat. In deze leucocyten is de activiteit van alkalische fosfatase opvallend sterk. Dit zagen wij in ons materiaal bij gevallen van acute appendicitis, cholecystitis en salpingitis.

In de coupes zijn in de leucocytaire infiltraten de polynucleaire leucocyten met zwart cobaltsulfide beladen cellen. De kernen zijn vaak als uitsparingen in het zwarte cellichaam te onderkennen.

In bloeduitstrijkjes is activiteit van alkalische fosfatase in normale omstandigheden alleen aanwezig in rijpe polynucleaire leucocyten (afb. 7). Bij de mens wisselt het aantal polynucleaire leucocyten, waarin alkalische fosfatase activiteit zichtbaar te maken is, sterk. 43-95% van de polynucleaire leucocyten zijn negatief (Kaplow 1955), zie ook hoofdstuk IIIb.

Bij infectieziekten stijgt het percentage polynucleaire leucocyten, waarin alkalische fosfatase is aan te tonen (Wachstein 1946). Ook uit biochemische bepalingen van de alkalische fosfatase activiteit in leucocyten suspensies blijkt, dat bij infectieziekten de alkalische fosfatase activiteit toeneemt (Valentine, Beck 1954). Deze stijging van de alkalische fosfatase activiteit werd door Valentine c.s. (1956) ook waargenomen in de leucocyten van geopereerde patiënten. Na een grote operatie, bijvoorbeeld maagresectie bij ulcus ventriculi, stijgt met een latentietijd van 24-72 uur de activiteit van alkalische fosfatase in de polynucleaire leucocyten. Met ACTH kan een analoog effect worden verkregen (Valentine c.s. 1957). Indien zij normale mensen met ACTH inspoten, steeg de activiteit van alkalische fosfatase in leucocyten suspensies van deze mensen. Deze stijging begon enkele uren na de injectie, een maximum werd bereikt na 72 uur. Bij patiënten, die leden aan de ziekte van Addison was dit ACTH effect niet op te wekken.

Uit deze waarnemingen en experimenten lijkt het waarschijnlijk, dat de stijging van de activiteit van alkalische fosfatase in de polynucleaire leucocyten een gevolg is van de invloed van bijnierschorshormonen. De activiteit van alkalische fosfatase in de polynucleaire leucocyten in ontstekingsinfiltraten is dus waarschijnlijk een afspiegeling van de toegenomen activiteit van alkalische fosfatase in de leucocyten in het perifere bloed tengevolge van de „stress"-

toestand. Een tweede ontstekingskenmerk, de aanwezigheid van talrijke capillairen, is duidelijk te zien, doordat in de endotheelcellen van de capillairen activiteit van alkalische fosfatase is waar te nemen. Het lijkt alsof in ontstekingsinfiltraten de endotheelcellen van alle capillairen alkalische fosfatase bevatten.

Bij meer *chronische ontstekingsprocessen* staat de proliferatie van de capillairen en van het bindweefsel op de voorgrond. In capillair endotheel en in jonge fibroblasten is een vrij hoge activiteit van alkalische fosfatase aanwezig (afb. 10). We vinden dan ook activiteit van alkalische fosfatase waar proliferatie van capillairen en bindweefsel optreedt. Dit is een algemeen geldend principe, waarbij het niet van belang is wat de aanleiding tot deze proliferatie van capillairen en bindweefsel was. Bij chronische ontstekingsprocessen in long, nier, galblaas en appendix, in granulatieweefsel, bij de wondgenezing, steeds is de activiteit van alkalische fosfatase verhoogd.

Bij het begin van de vorming van de collageenbundels, is met een van G i e s o n-kleuring, nadat het cobaltsulfide-neerslag is gevormd, de enzymactiviteit te localiseren in de fibroblasten, die tussen deze bundels in liggen.

Ook met het polarisatiemicroscoop zijn dan dubbelbrekende collageen bundels tussen de fibroblasten met activiteit van alkalische fosfatase te zien. Deze activiteit van alkalische fosfatase verdwijnt na de collagenisatie, als het proces tot rust gekomen is. Wij hebben dus in de histochemische alkalische fosfatasetechniek een middel om de activiteit van de vezelvorming te beoordelen.

De beschrijving van de activiteit van alkalische fosfatase bij de *wondgenezing* sluit goed aan bij de waarnemingen over de activiteit van alkalische fosfatase in ontstekingsprocessen. Ons ontbreekt hierover de ervaring, maar uit de literatuur blijkt het volgende:

Experimenteel is het verband tussen vezelvorming, fibroblastenactiviteit en alkalische fosfatase onderzocht bij wondgenezing (F e l l 1943, D a n i e l l i 1945, G o u l d 1951, F r e n c h 1954).

Huidwonden bij ratten en caviae genezen met vorming van granulatieweefsel. In de eerste dagen is er slechts activiteit van alkalische fosfatase in het leucocytair infiltraat waar te nemen. Na ongeveer 1 week, als er gedeeltelijke epithelialisatie is, is er in het fibreuze granulatieweefsel sterke activiteit van alkalische fosfatase in vaatendotheel en fibroblasten te zien.

G o u l d c.s. (1951) onderzocht of alkalische fosfatase een directe invloed heeft op de wondgenezing. Vastende ratten hebben een laag, vetrijk gevoede ratten een zeer hoog gehalte aan alkalische fosfatase in het serum. Hij vond echter, dat huidwonden even snel genezen bij vastende, normaal gevoede en

vetrijk gevoede ratten. De activiteit van alkalische fosfatase in de wond liet geen verschillen zien.

Gould besluit uit deze experimenten, dat alkalische fosfatase in het serum geen verband houdt met de activiteit van fosfatase in het wondgebied. Ook het locaal in het wondgebied toedienen van alkalische fosfatase of van fosfatase remmers, cysteine of thioglycolaat heeft geen invloed op de wondgenezing en evenmin op de activiteit van alkalische fosfatase van de cellen in de wond (Gould c.s. 1951).

Wonden in vitamine C deficiente caviae genezen slecht, de activiteit van alkalische fosfatase in de wond is te verwaarlozen. Locaal toedienen van alkalische fosfatase op de wond brengt hierin geen verandering (Danielli c.s. 1945).
Caviae met een tekort aan vitamine C hebben lage alkalische fosfatase waarden in het serum (Scoz c.s. 1937).

Danielli c.s. (1945) zowel als Gould c.s. (1951) hebben gemeend, dat de activiteit van alkalische fosfatase gelocaliseerd was op de collagene vezels. Beide onderzoekers komen op grond van hun experimenten tot de conclusie, dat alkalische fosfatase geen invloed heeft op de vezelvorming. Zij denken, dat de activiteit van alkalische fosfatase, die zij op de vezels waarnemen, ontstaat door adsorptie van dit enzym uit het serum.

Onze waarnemingen zijn hiermee niet in overeenstemming. Wij zien de activiteit van alkalische fosfatase in het protoplasma van de fibroblasten. De enzymactiviteit is ook aanwezig in fijne uitlopers van de fibroblasten. Als de fibroblasten dicht opeen liggen is echter niet altijd met zekerheid uit te maken of de activiteit van alkalische fosfatase in uitlopers van de fibroblasten aanwezig is of dat de enzymactiviteit op de collagene vezels gelocaliseerd is.

Als de activiteit van alkalische fosfatase echter in het protoplasma van de fibroblasten aanwezig is en niet op de collagene vezels is er geen reden om adsorptie van dit enzym uit het serum te veronderstellen. Op grond van het intracellulaire voorkomen van de alkalische fosfatase is het minder waarschijnlijk, dat in de wond gebrachte alkalische fosfatase of alkalische fosfatase remmers invloed op de wondgenezing kunnen hebben.

Bij caviae met gebrek aan vitamine C gaat een slechte wondgenezing samen met een lage activiteit van alkalische fosfatase in het serum. Er behoeft geen verband tussen deze twee verschijnselen te bestaan. De lage activiteit van alkalische fosfatase in het serum is waarschijnlijk het gevolg van de eveneens door vitamine C deficientie veroorzaakte storing in de verbening (Bourne

1948). De slechte wondgenezing is dan eveneens een uiting van het vitamine C gebrek.

French (1954) meent in de nabijheid van het regenererend epitheel de sterkste activiteit van alkalische fosfatase te zien, hij ponst huidlapjes uit, die met het epitheel naar onder in de wond worden geplaatst. Hij neemt nu de sterkste activiteit van alkalische fosfatase waar in het granulatieweefsel, dat tegen dit geïmplanteerde epitheel ontstaat. Hij komt tot de conclusie, dat de alkalische fosfatase activiteit geïnduceerd wordt door de epitheelcellen.

Wij menen echter uit ons pathologisch materiaal te mogen besluiten, dat overal waar activiteit van fibroblasten is, en waar nog geen volledige collagenisatie is opgetreden, activiteit van alkalische fosfatase aanwezig is. Wij namen dit waar in de bodem van ulcera, in chronische ontstekingsprocessen, rond oudere granulomen, rond tuberculeuze kaashaarden en bij reacties op vreemde lichamen. In al deze gevallen is in fibroblasten alkalische fosfatase histochemisch zichtbaar te maken.

Dit is ook het geval in het stroma van tumoren, indien de fibroblasten er actief zijn; dit is bijvoorbeeld het geval in mammacarcinomen, waarin veel bindweefsel gevormd wordt. Als het bindweefsel echter centraal in de tumor hyaliniseert, is de activiteit van alkalische fosfatase geheel verdwenen. Aan ons materiaal zijn geen argumenten te ontlenen voor een inducerende invloed van het epitheel op de activiteit van alkalische fosfatase.

De hoge activiteit van alkalische fosfatase in de fibroblasten is een begeleidend verschijnsel bij de collageenvorming. In hoeverre het enzym bij dit proces betrokken is, is niet duidelijk. Maar de activiteit van alkalische fosfatase is als maat te gebruiken voor de activiteit van de vezelvorming. Dit voert ons tot de vraag of wij in staat zijn, op grond van onze waarnemingen ook in andere organen, de functietoestand van cellen te bepalen aan de hand van de histochemisch aan te tonen activiteit van alkalische fosfatase.

De activiteit van alkalische fosfatase en celfunctie

Uit het bovenstaande werd duidelijk, dat de activiteit van alkalische fosfatase in fibroblasten een functietoestand van deze cellen weergeeft: een toestand, waarin deze fibroblasten vezels doen ontstaan. Zodra de fibroblasten geen vezels meer vormen en fibrocyten worden, gaat de activiteit van alkalische fosfatase verloren.

Wij zoeken eigenlijk steeds naar methoden, waarmee het ons mogelijk zal zijn om veranderingen in de functie van organen en cellen te herkennen, voor-

dat er morfologische veranderingen waarneembaar zijn. Histochemische enzymmethoden lijken reeds bij voorbaat daartoe geschikt, daar we veronderstellen, dat bij — al of niet pathologische — veranderingen in de functies van de cellen in de eerste plaats de stofwisseling verandert en dat pas na enige tijd de morfologische veranderingen waarneembaar zullen zijn. Het is echter niet te verwachten, dat geringe veranderingen in enzymactiviteit met de kwalitatieve histochemische methoden zijn aan te tonen. Indien een zo sterke daling of stijging van de enzymactiviteit optreedt, dat deze met histochemische methoden visueel te beoordelen is, zullen er wel reeds morfologische veranderingen te zien zijn. In het algemeen is dit dan ook het geval. In hoofdstuk IIIb wordt de cyclische verandering van de activiteit van alkalische fosfatase in het *endometrium* beschreven. Parallel aan deze veranderingen — stijging en daling — van de enzymactiviteit gaan morfologische veranderingen. Wij kunnen immers bij microscopisch onderzoek zeer goed een endometrium in de proliferatiefase van een endometrium in de secretiefase onderscheiden.

Helemaal parallel gaat echter de cyclische verandering van de activiteit van alkalische fosfatase en het morfologische celbeeld niet. In de menstruele fase is in het algemeen de activiteit van alkalische fosfatase geheel uit de epitheelcellen verdwenen. Uitsluitend in de endotheelcellen van de capillairen en in de polynucleaire leucocyten is dan nog alkalische fosfatase aan te tonen. Bij het onderzoek van ons materiaal bleek echter, dat er in een gering aantal van de onderzochte endometriumbiopsieën in de menstruele fase nog enige activiteit van alkalische fosfatase in de epitheelcellen bestond. In enkele andere gevallen zagen we echter, dat de activiteit van alkalische fosfatase reeds verdwenen was, voordat in het endometrium duidelijk dissociatie te zien was.

Men kan dit verschijnsel beschouwen als individuele variatie, maar aan de andere kant blijft de waarneming, dat in morfologisch identieke endometriumepitheelcellen verschil in enzymactiviteit kan bestaan. Mogelijk zijn deze verschillen op andere wijze te verklaren en wijzen zij erop, dat de concentraties van hormonen bij deze gevallen niet gelijk was. Wij konden dit niet onderzoeken, maar menen, dat het de moeite waard kan zijn de oorzaak van deze verschillen na te gaan.

In het *nierweefsel,* dat wij onderzochten, was in verscheidene pathologische omstandigheden de activiteit van alkalische fosfatase in de tubuli contorti gedaald.

Men heeft experimenteel getracht deze daling van de activiteit van alkalische fosfatase te bewerkstelligen. Op deze wijze hoopte men dan meer te weten te komen over de functionele betekenis van alkalische fosfatase in de nier. Na

bijvoorbeeld afbinden van de ureter, waardoor hydronefrose ontstaat, vermindert de activiteit van alkalische fosfatase sterk en kan zelfs geheel verdwijnen. Het verschijnsel blijkt echter reversibel te zijn, indien de obstructie na korte tijd weer opgeheven wordt (Wilmer 1944, Eränko 1954). Ook na het afbinden van de niervaten is er een daling van de activiteit van alkalische fosfatase te zien in de nier van de rat (Wilmer 1944). Onder invloed van verschillende toxische stoffen, die de tubulus min of meer beschadigen, daalt de fosfatase activiteit eveneens. In tubuluscellen die necrobiotisch zijn door sublimaatvergiftiging, is nog veel alkalische fosfatase aanwezig. Deze bevindt zich echter niet in de borstelzoom, maar diffuus in het celprotoplasma. Hepler (1945), Fonnesu (1952), Staemmler (1956). Brengt men ratten in shock door toediening van clostridium perfringenstoxine, dan verdwijnt de activiteit van alkalische fosfatase uit de nier bijna geheel (Berg 1954, 1955).

De drie genoemde manipulaties, namelijk het afbinden van ureter of niervaten of het toedienen van toxische stoffen hebben alle een sterke beschadiging van de nieren met duidelijke morfologische veranderingen tot gevolg. De activiteit van alkalische fosfatase gaat dus parallel met de algemene toestand van de nier. Met welke functie, specifieke of algemene, de alkalische fosfatase verband houdt is door dit soort beschadigingen niet uit te maken. Dat activiteit van alkalische fosfatase parallel gaat met urineproductie, blijkt uit het feit, dat in nieren van embryonen, activiteit van alkalische fosfatase pas aantoonbaar is, als deze nieren functioneren (Eränko 1954, Davies 1952). Na toedienen van phloridzine, waarmee de terugresorptie van glucose in de nier wordt belemmerd, verandert volgens sommige auteurs o.a. Kritzler (1941), Allegra c.s. (1954), de activiteit van alkalische fosfatase in de nier niet, volgens anderen ontstaat een daling (Marsh 1946, Allegra 1954).

Door phloridzine worden echter vele enzymen beschadigd die een rol spelen bij glycolysis en oxidatie, zodat een eventuele daling van de activiteit van alkalische fosfatase nog geen uitsluitsel geeft over de rol van dit enzym bij de terugresorptie van glucose (Baldwin 1957, p. 245).

Als ratten deficient gevoed worden met betrekking tot kalium en eiwit, daalt de activiteit van alkalische fosfatase in de tubuli contorti (Pearse 1957). Dit is niet het geval als aan deze ratten uitsluitend het kalium of het eiwit wordt onthouden.

In deze experimenten en in andere experimenten, waarbij de hormonale invloeden op activiteit van alkalische fosfatase in de nier zijn onderzocht, heeft men te doen met meer subtiele invloeden, dan na grove laesies zoals die ontstaan bij afbinden van vaten en/of ureter. Men zou zo in principe meer

gegevens over de functie van het enzym kunnen verkrijgen.

Een bijzonder interessant geval waarvan we nierweefsel konden onderzoeken, was dat van een symmetrische ischaemische schorsnecrose. Deze patiënte werd met peritoneale dialyse 87 dagen in het leven gehouden (De Graeff, de Baan 1959). De oorzaak van de symmetrische schorsnecrose was niet geheel duidelijk geworden. Zeven dagen voordat de anurie begon, had de patiënte zich ziek gevoeld en keelpijn gehad. Op de twintigste dag van de anurie was een nierbiopsie gedaan, waarbij alleen necrotisch nierweefsel werd verkregen. Er waren toen reeds uitgebreide kalkneerslagen. Na 32 dagen was de diurese weer op gang gekomen en werd van 500 tot 1500 cc urine per dag geproduceerd. Op de 35e dag kreeg de patiënte hypertensie, de bloeddruk steeg tot 180 systolisch, 130 diastolisch. Op de 87e dag na het begin van de anurie overleed patiënte onder het beeld van longoedeem. De doodsoorzaak was dus niet de nierinsufficiëntie, maar de nefrogene hypertensie.

Op grond van de klinische waarnemingen: urine met constant soortelijk gewicht, urea clearance van 3%, de uitscheiding van kalium van ongeveer 15 m Eq. per dag, verwachtte men, dat het merendeel van de nefronen volledig en onherstelbaar te gronde zou zijn gegaan en slechts een klein percentage nefronen intact zou zijn. Belangrijk was nog de klinische waarneming, dat er geen glucose in de urine was aan te tonen.

Morfologisch bleek het grootste deel van de glomeruli necrotisch te zijn, terwijl de nog resterende juxta medullaire glomeruli ook sterk veranderd waren. De glomeruli waren ten dele hypertrofisch, andere glomeruli waren gedeeltelijk necrotisch. De resterende tubuli waren deels bekleed met sterk gezwollen epitheelcellen, de meeste tubuli waren atrofisch.

Nergens was in de epitheelcellen van de tubuli contorti activiteit van alkalische fosfatase aan te tonen. Daar er in de urine geen glucose was aan te tonen, menen we tot de conclusie te mogen komen, dat alkalische fosfatase in de nier geen functie vervult bij de terugresorptie van glucose.

We zien dus in pathologische veranderde nieren, dat de activiteit van alkalische fosfatase daalt of verdwijnt. Wij menen, dat de practische betekenis hiervan is, dat op deze wijze een schatting gemaakt kan worden van het aantal normaal functionerende nefronen. Het ontbreken van alkalische fosfatase betekent echter nog niet, dat alle functies van de tubuli contorti verloren zijn gegaan. Dit blijkt duidelijk uit het geval van de patiënte met symmetrische ischaemische schorsnecrose. Welke functie de alkalische fosfatase in de borstelzoom van de tubuli contorti heeft, weten we niet, maar dat het enzym niet speciaal van belang is voor de terugresorptie van glucose is wel bijna zeker.

Indien men in een orgaan in uiteenlopende fysiologische of experimentele omstandigheden morfologisch geen verschillen waarneemt, kan men trachten om met histochemisch onderzoek verschillen te vinden.

Dat dit niet steeds tot resultaten leidt, leren ons de volgende waarnemingen:

De alkalische fosfatase activiteit in een aantal *muizeovaria* werd bestudeerd om te onderzoeken of er verschillende enzymactiviteiten zijn bij zwangere, niet zwangere en pseudo-zwangere muizen. Bij muizen zijn in vaginale uitstrijkjes cyclische veranderingen te zien, die in de graviditeit worden onderbroken. Ook indien vrouwelijke muizen copuleren met gesteriliseerde mannetjes — en zelfs spontaan, als enige vrouwelijke muizen tezamen in een kooi zitten — kan deze cyclus tijdelijk in de corpus luteumfase blijven steken. Dit noemt men pseudo-graviditeit; na ongeveer tien dagen beginnen de normale cycli dan weer. Het is tot nu toe niet gelukt, om bij de muis progesteron in de normale cyclus aan te tonen. In de graviditeit worden door de invloed van progesteron, dat in de corpora lutea geproduceerd wordt, de cyclische veranderingen van het vaginaal slijmvlies gestopt. Men zou dus verwachten, dat er verschillen zijn tussen de corpora lutea van zwangere en niet zwangere muizen. Het is tot nu toe echter niet gelukt, om met histologische methoden verschillen aan te tonen tussen corpora lutea van zwangere muizen en corpora lutea van muizen in de pro-oestrus. Het lijkt de moeite waard, te onderzoeken of er verschillen te vinden zijn in de activiteit van de fosfatasen.

De ovaria van resp. 5 normale muizen in corpus luteumfase, 5 zwangere muizen en 5 pseudo-zwangere muizen werden onderzocht.

In muizeovaria is zeer weinig stroma, waarin vele follikels in verschillende stadia van rijping en talrijke corpora lutea van verschillende generaties liggen

In het ovarium van de muis is activiteit van alkalische fosfatase waar te nemen in de endotheelcellen van capillairen. Tevens is activiteit van alkalische fosfatase zichtbaar te maken in de cellen van corpora lutea. Deze activiteit is gering in de corpora lutea, die in de periferie van de ovaria liggen, wordt sterker naarmate de corpora lutea meer van het oppervlak van het ovarium verwijderd zijn. Dit zijn de oudere corpora lutea. De activiteit van zure fosfatase is eveneens het hoogst in de oudere corpora lutea.

Er waren geen verschillen tussen de ovaria van de drie onderzochte groepen muizen, ook niet in de activiteit van de fosfatasen.

Dat in dit geval geen verschillen in de activiteit van fosfatasen gevonden werden, is op verschillende manieren te duiden. Het is mogelijk, dat de fosfatasen niet betrokken zijn bij de hormoonproductie in deze cellen. Het lijkt de moeite waard om dit onderzoek te herhalen en daarbij de talrijke andere histo-

chemische enzymmethoden toe te passen, die ons heden ter beschikking staan. Een andere mogelijkheid is, dat de verschillen in de activiteit van de fosfatasen te gering zijn om met het blote oog waar te nemen.

Algemene beschouwingen over de mogelijke betekenis van alkalische fosfatase

Wij willen dit hoofdstuk niet eindigen zonder ons af te vragen of wij uit onze waarnemingen af kunnen leiden in welk stofwisselinsgproces alkalische fosfatase een rol speelt.

In hoofdstuk II werd reeds vermeld, dat verscheidene onderzoekers op grond van het tezamen voorkomen van alkalische fosfatase en andere organische bestanddelen meenden, dat alkalische fosfatase van belang is voor de vorming van deze organische bestanddelen. Volgens onze waarnemingen blijkt het echter niet mogelijk te zijn om *alle* gevonden localisaties van activiteit van alkalische fosfatase met een bepaalde histochemisch localiseerbare verbinding te correleren. Om te beslissen over de functie van alkalische fosfatase moet men over krachtiger of talrijker argumenten beschikken.

Er is een syndroom beschreven onder de naam *familiaire hypofosfatasaemie* bij kinderen die verbeningsstoornissen hebben en waarbij lage activiteit van alkalische fosfatase in het serum gevonden wordt. Ook bij de familieleden blijkt de activiteit van alkalische fosfatase in het serum laag te zijn.

Oorspronkelijk werd deze ziekte beschouwd als vitamine D resistente rachitis. Bij deze patiënten met hypofosfatasaemie bestaat verhoogde uitscheiding van fosfoaethanolamine in de urine (Fraser 1955, Lanman 1955, McCance 1955).

Aethanolamine is een bouwsteen van amino-aethanol cephaline, een verbinding uit de groep der fosfolipiden. Het grootste deel van het aethanol-amine wordt door transmethylering omgezet in choline (Fruton en Simmonds 1953, bl. 708).

Choline is weer een bestanddeel van andere fosfolipiden zoals lecithine en sphingomyeline. Het blijkt, dat bij het ziektebeeld van de hypofosfatasaemie, de verwerking van het fosfoaethanolamine niet meer normaal mogelijk is.

Daar bij metabolische processen vaker wordt waargenomen, dat bij het ontbreken van een enzym het substraat van dit enzym wel gevormd wordt, maar niet verwerkt wordt, zou dit er op kunnen wijzen, dat in normale omstandigheden fosfoaethanolamine door alkalische fosfatase wordt gehydrolyseerd. Daar alkalische fosfatase als transfosforylase kan werken (Fruton en Simmonds 1953, bl. 517) lijkt het mogelijk, dat fosfoaethanolamine als

fosforzuurgever dient. Dat aethanolamine een fosforzuurbron is, terwijl deze stof bovendien een bouwsteen is van fosfolipiden, bracht ons op de misschien wel onjuiste gedachte, dat het enzym alkalische fosfatase van belang is voor de stofwisseling van deze lipiden.

Fosfolipiden zijn in kleine hoeveelheden in alle weefsels aanwezig. In cellen van bijnierschors en corpora lutea, waarin veel lipiden aanwezig zijn, is alkalische fosfatase activiteit aan te tonen.

In andere cellen echter, waarin veel lipiden aanwezig zijn, zoals de interstitiële cellen van L e y d i g in de testis, is de activiteit van het enzym histochemisch bij de mens niet aantoonbaar. Dit is echter wel het geval in de interstitiële cellen van de rattetestis.

In het G o l g i-netwerk van duodenum en epididymis, waarin lipiden aanwezig zijn, is alkalische fosfatase aan te tonen, maar in andere organen is dit weer niet het geval.

In het hersenweefsel van de volwassen mens is geen alkalische fosfatase aanwezig, behalve in de endotheelcellen van de kleine vaten. Daarentegen is in het hersenweefsel van embryonen diffuus een geringe activiteit van alkalische fosfatase te zien voor de myelinisatie heeft plaats gehad.

Enkele van de gevonden localisaties van activiteit van alkalische fosfatase zouden kunnen passen bij een functie in de celstofwisseling der lipiden daar ter plaatse.

Er zijn dus argumenten te vinden voor de stelling, dat er verband moet bestaan tussen de activiteit van alkalische fosfatase en de stofwisseling van lipiden. Deze aanwijzingen zijn echter niet duidelijk genoeg om er conclusies uit te trekken.

In de meeste van de gevonden localisaties van de activiteit van alkalische fosfatase bestaat er geen direct verband met de stofwisseling van fosfolipiden. Bij de familiaire hypofosfatasaemie is de verbening gestoord, terwijl in de urine teveel fosfoaethanolamine wordt uitgescheiden. Het lijkt er dus op, dat alkalische fosfatase in normale omstandigheden, deze stof in voldoende mate splitst, zodat deze stof dan niet met de urine uitgescheiden wordt.

Wij veronderstellen, dat fosfoaethanolamine een van de bronnen van fosfaationen is op alle plaatsen, waar activiteit van alkalische fosfatase kan worden aangetoond. Bij de verbening wordt dit fosfaation mogelijk ingebouwd in de matrijs waarop de beenzouten zich afzetten. Bij de collageenvorming wordt het fosfaation mogelijk ingebouwd in zure mucopolysacchariden van de bindweefseltussenstof.

Dit zijn echter veronderstellingen waarvoor vooralsnog voldoende bewijzen ontbreken.

HOOFDSTUK IIIb

SYSTEMATISCHE BESCHRIJVING VAN DE ACTIVITEIT VAN ALKALISCHE FOSFATASE IN NORMALE OMSTANDIGHEDEN

De organen en weefsels worden besproken in de volgorde van de coderingslijst van het Pathologisch Laboratorium. Deze lijst is te vinden aan het einde van de illustraties. Niet elk punt van de coderingslijst is afzonderlijk vermeld, daar dan bij de beschrijvingen te veel herhaald zou moeten worden. In het algemeen worden alleen de positieve reacties vermeld.

De negatieve reacties worden niet steeds beschreven. De weefsels, die niet onderzocht werden, zijn weggelaten, behalve als een typische localisatie uit de literatuur bekend was.

Tractus circulatorius

10—15 *Hart en bloedvaten*

Zoals reeds in het begin van dit hoofdstuk werd opgemerkt, is alkalische fosfatase aan te tonen in de endotheelcellen van capillairen en van arteriolae en venulae met een doorsnede die kleiner is dan ± 50μ (afb. 8a, 8b).

Het endotheel van grotere vaten en het endocard toont geen activiteit van alkalische fosfatase. Wel is er in de endotheelcellen van de vasa vasorum in de grotere vaten activiteit van alkalische fosfatase aanwezig. Indien bij de vermelding van activiteit van alkalische fosfatase in de verschillende organen de endotheelcellen van de vaten worden genoemd, is hiermee de activiteit in de endotheelcellen van capillairen, arteriolae en venulae bedoeld.

In hartspiervezels en gladde spiervezels in de vaatwanden is geen alkalische fosfatase aan te tonen.

16 *Bloed*

Onze ervaring met uitstrijkjes van bloed en beenmerg is niet groot. Wel is ons gebleken, dat korte fixatie in alcohol 80% voor bloeduitstrijkjes betere resultaten geeft, dan fixatie in aceton. Na fixatie incuberen wij deze uitstrijkjes gedurende 1 of 2 uur in de incubatievloeistof.

Wachstein (1946) onderzocht als eerste bloed en beenmerg van de mens en verschillende andere zoogdieren. Uit zijn onderzoek en eveneens uit recente onderzoekingen (Frost 1955, Wiltshaw en Moloney 1955, Kaplow 1955) blijkt, dat alleen rijpe polynucleaire leucocyten alkalische fosfatase (afb. 7) bevatten en dat de activiteit ontbreekt — ook in rijpe leucocyten — bij leucaemieën.

Onze ervaring is, dat bij enkele normale personen zelfs ook bij herhaald onderzoek in geen enkele polynucleaire leucocyt alkalische fosfatase histochemisch is aan te tonen. Bij de meeste mensen is er in een deel van de rijpe polynucleaire leucocyten activiteit van alkalische fosfatase in het protoplasma.

Bij onderzoek van bloed van verschillende dieren (Wachstein 1946) blijkt, dat er opvallende soortverschillen bestaan. Leucocyten van mens, cavia, rat en konijn bevatten wel alkalische fosfatase, leucocyten van muis en hond nooit. Alle overige bloedcellen zijn negatief.

17 *Lymfeklieren*

Het vaatendotheel bevat alkalische fosfatase. De cellen die de sinus bekleden zijn negatief. Terwijl de reactiecentra geheel vrij zijn van cobaltsulfide-neerslag, is de rest van het lymfatisch weefsel zwak grijs gekleurd, met een iets donkerder tint in het cytoplasma van de lymfocyten rond de reactiecentra. Er is dus een geringe activiteit van alkalische fosfatase in deze lymfocyten. In het perifere bloed is daarentegen in lymfocyten histochemisch geen alkalische fosfatase aan te tonen. In de reticulumcellen is geen activiteit van alkalische fosfatase waar te nemen.

18 *Milt*

In de milt is er, evenals in de lymfeklieren in de lymfocyten rond de reactiecentra geringe activiteit van alkalische fosfatase. De reactiecentra van de follikels laten geen enzymactiviteit zien. Het vaatendotheel bevat alkalische fosfatase, in het sinusendotheel is geen alkalische fosfatase aan te tonen.

19 *Beenmerg*

De beenmerguitstrijkjes, die wij onderzochten, waren afkomstig van secties. Er was een diffuse grijszwarte kleuring in alle cellen en celkernen, zodat de localisatie van de activiteit van alkalische fosfatase niet te beoordelen was. Dit is een gevolg van postmortale autolyse en treedt reeds op tussen 2 en 4 uur na de dood (Gössner 1955).

Het toepassen van deze methode op beenmerguitstrijkjes van secties lijkt dus niet goed mogelijk.

Tractus respiratorius

22 *Trachea*

23 *Bronchi*

In het epitheel van trachea en bronchi is er een merkwaardige verdeling van de activiteit van alkalische fosfatase. De trilhaarzoom is voor het grootste deel positief. Bovendien is er in het meerrijig cylindrisch epitheel een wisselend brede zoom basale cellen, waarin alkalische

fosfatase aan te tonen is. Vaak is deze basale laag één cel dik, plaatselijk kan ze in bronchi geheel ontbreken.

Het epitheel van de bronchioli is grotendeels negatief, onregelmatig verspreid zijn er enkele cellen met activiteit van alkalische fosfatase in de trilhaarzoom. Basaal liggen er in sommige bronchioli afgeplatte cellen, die alkalische fosfatase bevatten. Het beeld doet hierdoor enigszins denken aan dat van mammaklierbuisjes met myoepitheliale cellen. In de epitheelcellen van de bronchiale klieren van de mens ontbreekt alkalische fosfatase. Bij de big zagen we deze enzymactiviteit echter wel. Alleen de endotheelcellen van de kleinere vaten in de wand van de trachea en bronchi bevatten alkalische fosfatase.

24 *Long*

In de epitheelbekleding van de alveolen zijn verspreid plaatsen met activiteit van alkalische fosfatase te vinden. Waarschijnlijk zijn dit de plaatsen waar de zeer dunne platte epitheelcellen perinucleair wat meer cytoplasma hebben. Het lijkt hierdoor alsof verspreid over de wanden van de alveoli slechts enkele epitheelcellen alkalische fosfatase bevatten. Waar de alveoli tegen bindweefsel aanliggen, peribronchiaal, bij de longsepta en subpleuraal zijn de epitheelcellen enigszins gezwollen. Op deze plaatsen is duidelijk de activiteit van alkalische fosfatase in het gehele cytoplasma te zien.

In de wand van de alveolaire capillairen bevatten slechts enkele endotheelcellen alkalische fosfatase. Wel is er alkalische fosfatase in endotheelcellen van capillairen, die rond bronchi en grotere vaten, in longsepta en subpleuraal gelegen zijn.

Tractus digestivus

33 *Speekselklieren*

In de cellen van de acini is geen alkalische fosfatase aan te tonen. Wel is in het lumen van de afvoergangen activiteit van alkalische fosfatase in het secreet en tegen het oppervlak van de epitheelcellen te zien. Ook met biochemische methoden heeft men alkalische fosfatase in het secreet aangetoond. Slechts enkele capillairen tussen de acini laten activiteit van alkalische fosfatase zien in de endotheelcellen. De endotheelcellen van kleinere vaten in bindweefselsepta en rond afvoergangen zijn steeds duidelijk positief.

36 *Oesophagus*

Er is in het slijmvlies geen enzymactiviteit. Alleen de endotheelcellen van de kleinere vaten bevatten alkalische fosfatase.

37 *Maag*

De epitheelcellen van het maagslijmvlies bevatten in normale magen geen activiteit van alkalische fosfatase.

De endotheelcellen van de capillairen en kleinere vaten in de mucosa, submucosa, muscularis en subserosa bevatten alkalische fosfatase. Het verloop van de capillairen in het slijmvlies is hierdoor goed te vervolgen in dikke coupes. Er is een basaal gelegen netwerk van capillairen op de grens van mucosa en submucosa. Van dit netwerk uit ontspringen capillairen, die even-

wijdig tussen de crypten naar het oppervlak lopen. Deze capillairen vertakken zich slechts in geringe mate rond de epitheelcellen.

38 *Duodenum* (afb. 3)

De sterkste activiteit van alkalische fosfatase in dierlijke weefsels is biochemisch aangetoond in het slijmvlies van de dunne darm. Histochemisch blijkt deze activiteit gelocaliseerd te zijn in de apicale borstelzoom van de epitheelcellen. Vlak onder de borstelzoom ligt, apicaal van de kern, het Golgi netwerk, dat een vrij sterke alkalische fosfatase activiteit laat zien. Fredericsson (1956) prepareerde in coupes met een micromanipulator de borstelzoom af en incubeerde daarna de coupes. Hij zag in deze coupes toch dezelfde activiteit van alkalische fosfatase in het Golgi apparaat. Deze activiteit in het Golginet ontstaat dus niet tijdens de incubatie door diffusie van het enzym of van een van de reactieproducten uit de sterk actieve borstelzoom. Er zijn ook andere gegevens bekend over een verband tussen alkalische fosfatase en het Golginet. Schneider en Kuff (1954) gelukte het om in homogenaten van ratten epididymis, met gefractioneerde centrifugatie het Golginet afzonderlijk te isoleren. Hij vond hierin o.a. alkalische fosfatase. Ook histochemisch is in ratten epididymis alkalische fosfatase in het Golginet te zien.

De activiteit in de apicale zoom wordt in het distale deel van de dunne darm minder sterk, maar is tot in het laatste deel van het ileum aanwezig.

41 *Colon*

42 *Appendix*

43 *Rectum*

In het epitheel van de dikke darm ontbreekt activiteit van het enzym. Alleen tegen het oppervlak van de epitheelcellen is vaak enige activiteit van alkalische fosfatase aanwezig. Deze enzymactiviteit is onregelmatig verdeeld. Het zou kunnen zijn, dat dit aan de celwand geadsorbeerd enzym afkomstig is uit de darminhoud. Activiteit van alkalische fosfatase is te zien in de endotheelcellen van de kleinere vaten.

44 *Lever* (afb. 1)

Bij de mens is onder normale omstandigheden de alkalische fosfatase activiteit in een deel van de galcapillairen zichtbaar te maken. In de afvoerende galwegen is onregelmatig alkalische fosfatase activiteit tegen het celoppervlak te zien.

Het lijkt weer alsof dit door adsorptie van enzym uit de gal tegen het oppervlak ontstaat. De endotheelcellen van de sinus bevatten eveneens alkalische fosfatase. De enzymactiviteit in deze endotheelcellen is centraal in de leverkwabjes het sterkst. In het protoplasma van de levercellen is geringe diffuus verdeelde activiteit van alkalische fosfatase waar te nemen. Dit is goed te zien als in de lever tumormetastasen aanwezig zijn, waarvan de cellen geen alkalische fosfatase bevatten. Er is dan een duidelijk contrast van zwak gekleurde levercellen en geheel negatieve tumorcellen. De nucleoli van de levercelkernen bevatten eveneens alkalische fosfatase in tegenstelling tot de rest van de celkern (afb. 1). In de cellen van Kupffer is geen activiteit van alkalische fosfatase zichtbaar te maken.

45 *Galblaas*

De epitheelbekleding van de galblaas bevat geen alkalische fosfatase. Wel is er een wisselende activiteit van alkalische fosfatase te zien, die tegen het celoppervlak aan lijkt te liggen. De mogelijke betekenis hiervan wordt besproken op blz. 40.

47 *Pancreas*

De epitheelcellen van de exocriene acini en de epitheelcellen van de afvoergangen bevatten geen alkalische fosfatase. Wel zijn, evenals in de lever, de nucleoli van de exocriene cellen duidelijk positief. Bij de mens bevatten de cellen van de eilandjes van Langerhans geen activiteit van alkalische fosfatase. Dit is wel het geval bij de rat. In de perifeer gelegen cellen van de eilandjes van Langerhans is activiteit van alkalische fosfatase zichtbaar. Dit zijn dus waarschijnlijk de α cellen. Opvallend duidelijk is in het pancreas de alkalische fosfatase activiteit in de endotheelcellen van de vaten.

Tractus urogenitalis

50 *Testis*

In rijpe spermatozoën is geen alkalische fosfatase aan te tonen, maar in de overige cellen betrokken bij de spermatogenese is een matig sterke activiteit van alkalische fosfatase te zien. Opvallend is, dat in deze cellen, ondanks het gebruik van substraat met een vrij hoge calciumconcentratie, de kernen positief zijn. Of dit berust op een reeële alkalische fosfatase activiteit in de kernen, of dat het diffusie is van calciumfosfaat, kunnen we niet met zekerheid zeggen. De cellen van Sertoli bevatten alkalische fosfatase in het cytoplasma. In het interstitium zijn de endotheelcellen van de kleine vaten positief, de cellen van Leydig zijn negatief. Een onderzoek over de localisatie van alkalische fosfatase in de verschillende delen van de mannelijke geslachtsorganen van zeven zoogdiersoorten — rat, muis, cavia, konijn, goudhamster, vleermuis en buidelrat — is gedaan door Bern (1949).

Er blijken zeer grote verschillen in de verdeling van alkalische fosfatase te bestaan, ook tussen nauw verwante diersoorten.

51 *Epididymis* (afb. 5)

Slechts het endotheel van de vaten bevat alkalische fosfatase. In het epitheel van de epididymis zagen wij geen enzymactiviteit. Activiteit apicaal in de epitheelcellen is wel beschreven door Gomori (1941), maar zijn techniek was toen nog onvolkomen.

52 *Prostaat*

Behalve in de endotheelcellen van de vaten is er in enkele gevallen locaal alkalische fosfatase activiteit in het secreet in de klierbuisjes.

56 *Urethra*

57 *Blaas*

58 *Pyelum, Ureter*

Wij zien alleen activiteit van alkalische fosfatase in vaatendotheel. Gomori (1941) zag

met de methode, die hij oorspronkelijk gebruikte, activiteit van alkalische fosfatase in het overgangsepitheel van de urine afvoerwegen, o.a. bij de mens. Bij de muis konden wij deze waarneming ook doen, bij de mens zagen wij dit niet.

59 *Nier*

De sterkste activiteit van alkalische fosfatase valt waar te nemen in de borstelzoom van de epitheelcellen van de tubuli contorti en het afdalend deel van de lis van H e n l e. De enzymactiviteit is in de borstelzoom zeer hoog, zodat deze reeds na korte incubatie, bijvoorbeeld 5 minuten, duidelijk is waar te nemen. In de tubuli contorti van de eerste orde is de activiteit van alkalische fosfatase hoger dan in de tubuli contorti van de tweede orde en in de lis van H e n l e. De afvoerbuisjes zijn negatief.

In het endotheel van de capillairen tussen de tubuli contorti en verzamelbuisjes, evenals in het endotheel van de grotere arteriolae en venulae, ziet men activiteit van alkalische fosfatase. Opvallend is daarentegen dat in slechts een enkele endotheelcel van de capillairen in de glomeruluslissen alkalische fosfatase is aan te tonen. Bij dieren is deze verdeling dezelfde, alleen bij de kat heeft men activiteit van alkalische fosfatase in de glomeruli waargenomen.

66 *Ovarium*

Activiteit van alkalische fosfatase is waar te nemen in de cellen van corpora lutea. De activiteit is in oude corpora lutea sterker dan die in jonge.

Geen activiteit van alkalische fosfatase is waar te nemen in eicellen, theca- en granulosacellen.

In de endotheelcellen van de capillairen is alkalische fosfatase activiteit te zien. De capillairen zijn regelmatig verdeeld over het ovariumstroma, alleen rond grotere follikels is in de theca interna een verdichting van dit capillair net te zien. (Voor muizeovaria zie hoofdstuk IIIa).

61 *Tuba*

In het tubaepitheel is in de apicale zoom van de epitheelcellen alkalische fosfatase gelocaliseerd.

Alkalische fosfatase is tevens aan te tonen in het endotheel van de kleinere vaten.

62 *Uterus, myometrium*

Alleen in de cellen van het endotheel van de kleinere vaten komt activiteit van alkalische fosfatase voor.

63 *Endometrium*

De activiteit van alkalische fosfatase in het endometrium laat cyclische verschuivingen in intensiteit en localisatie zien.

Deze verschuivingen zijn vooral duidelijk te zien in de epitheelcellen, doch ook in geringere mate en niet steeds even fraai in de endotheelcellen van de kleinere vaten.

Vlak na de menstruatie is de activiteit gelocaliseerd in een smalle apicale zoom van de

epitheelcellen. Gedurende de proliferatiefase wordt deze apicale activiteit sterker, de apicale zoom wordt breder en aan het eind van de proliferatiefase is in het gehele protoplasma van de epitheelcellen sterke activiteit van alkalische fosfatase waar te nemen. Deze ontwikkeling treedt in de oppervlakkige lagen van het endometrium het eerst op; het laatst in de meer basaal gelegen delen van de buisjes. In het begin van de secretiefase is de activiteit van de alkalische fosfatase in de epitheelcellen maximaal. Gedurende de secretiefase is er activiteit van alkalische fosfatase in het epitheel en in het secreet in het lumen van de buisjes. Praemenstrueel is de activiteit in het epitheel verdwenen, slechts in de resten van het secreet in de buisjes is nog alkalische fosfatase activiteit te zien. In de menstruatiefase is er alleen activiteit van alkalische fosfatase in capillair endotheel en in enkele polynucleaire leucocyten. Het lijkt alsof deze activiteit in de endotheelcellen van de vaten het hoogst is in praemenstrueel endometrium. Deze cyclische veranderingen werden reeds beschreven door Arzac en Blanchet in 1948, Atkinson in 1947, Burton in 1953 en Jaszmann in 1958.

64 *Collum uteri, portio*

In het cylinderepitheel van de endocervix en in het klierbuisepitheel van de endocervix is activiteit van alkalische fosfatase waar te nemen in het apicale deel van de cellen. In het plaveiselepitheel van de portio bevatten de basale cellen soms locaal enige alkalische fosfatase. Daar in de basale en parabasale cellen in geprikkeld portioepitheel steeds geringe activiteit van alkalische fosfatase is te zien, is te overwegen of deze locale activiteit niet samenhangt met een geringe prikkeling van dit epitheel. In afbeelding 9 ontbreekt deze activiteit in de basale cellen.

65 *Vagina*

In het slijmvlies van de vagina, afkomstig van een vrouw in de menopauze, zagen wij geen activiteit van alkalische fosfatase. Lang c.s. (1954) beschrijft geringe alkalische fosfatase activiteit in de basale cellen. Deze enzymactiviteit laat geringe cyclische veranderingen zien. In de graviditeit is de activiteit het sterkst, in de menopauze slechts gering.

66 *Jonge vrucht*

67 *Foetus*

Onderzocht werden enkele doorsneden van een embryo van 9 cm kop-hiellengte en één van 6 mm kop-stuitlengte. Bij het 9 mm lange embryo is de alkalische fosfatase activiteit in principe op analoge wijze gelocaliseerd als bij de volwassene. In dit embryo was de sterkste activiteit van alkalische fosfatase te zien in de pijpbeenderen in de gebieden met enchondrale verbening.

In het 6 mm lange embryo was de diffuse activiteit van alkalische fosfatase in het zich ontwikkelende centrale zenuwstelsel opvallend. Deze activiteit is ook bij embryonen van de muis waargenomen en met de differentiatie van het zenuwstelsel in verband gebracht (Chiquoine 1954).

68 *Placenta en vliezen*

De activiteit van alkalische fosfatase in de chorionvlokken is zeer sterk in de cellen van de

syncytiotrofoblast. De cellen van de cytotrofoblast zijn negatief, resten hiervan, als enkele cellen onder de syncytiotrofoblast gelegen, zijn met behulp van de histochemische methode voor alkalische fosfatase gemakkelijk terug te vinden als negatieve cellen tussen de overige sterk positieve cellen van de syncytiotrofoblast.

Thomsen c.s. ziet zelfs in de laatste 20 weken van de gradiviteit nog enkele cellen van de Langhans laag onder de syncytiotrofoblast liggen. De endotheelcellen van de vaten bevatten weinig alkalische fosfatase. De Hoffbauer cellen zijn negatief.

69 *Mamma*

In normaal mammaklierweefsel is de alkalische fosfatase gelocaliseerd in de myoepitheliale cellen, die rond de acini en de kleinere afvoergangetjes liggen (afb. 18). Ook in mammaklierweefsel van een vrouw, die kort na een kunstverlossing overleed, is alleen alkalische fosfatase activiteit in de myoepitheliale cellen aanwezig. De endotheelcellen van de vaten bevatten, zoals steeds, alkalische fosfatase. Dempsey c.s. (1947) vond alkalische fosfatase activiteit in dezelfde localisaties. Hij zag tevens geringe alkalische fosfatase activiteit in het epitheel van de acini. Hij gebruikte echter incubatietijden van 3 tot 24 uur. Bij dergelijke lange incubatietijden is de kans op diffusie van de reactieproducten groot (Danielli 1946).

70 t/m 79 *Zenuwstelsel*

In hersenweefsel is de grijze stof diffuus zwak grijs getint. Dit neerslag ontstaat niet door enzymactiviteit, daar ook de contrôlecoupes dezelfde grijze tint laten zien. Waarschijnlijk is dit het gevolg van calciumimpregnatie.

In de cellen van het vaatendotheel is alkalische fosfatase activiteit te zien. Met de methode voor alkalische fosfatase is het capillair verloop in dikke coupes van hersenweefsel fraai zichtbaar te maken.

De capillairen liggen in de buitenste schorslagen veel dichter opeen, dan in de binnenste schorslagen en de grijze stof. Vooral in de plexus choroideus is, door het grote aantal dicht opeengelegen capillairen, de activiteit van alkalische fosfatase intensief. Bovendien bevatten de stromacellen alkalische fosfatase. In de bekledende ependymcellen is geen alkalische fosfatase te zien. Ook in het oog is er alleen activiteit van alkalische fosfatase in de endotheelcellen van de capillairen waar te nemen (Eichner 1956).

Huid, bewegingsapparaat

80 *Huid*

81 *Subcutis*

82 *Diep bindweefsel*

83 *Spieren*

84 *Pezen, bursae*

Er is slechts alkalische fosfatase activiteit in de endotheelcellen van de vaten.

86 t/m 89 *Beenderstelsel*

Enchondrale verbening

De zône waar de kraakbeencellen zwellen, is gekenmerkt door sterke activiteit van alkalische

fosfatase in chondrocyten en in de kraakbeentussenstof. Als er jong bot tegen de kraakbeenbalkjes wordt afgezet, blijft dit kraakbeen enzym bevatten. In het nieuw gevormde bot is echter slechts geringe enzymactiviteit te zien. Osteoblasten en osteocyten vlak onder het oppervlak van de botbalkjes zijn sterk positief. In oudere botbalkjes zijn de osteoblasten en de cellen van het endost positief. In enkele osteocyten is nog enzymactiviteit te zien, de beentussenstof is geheel negatief.

Periostale verbening

De osteoblasten en cellen van het periost bevatten veel alkalische fosfatase. Jong bot kleurt nauwelijks. Volwassen bot bevat geen alkalische fosfatase, alleen in de osteoblasten, periost- en endostcellen is steeds alkalische fosfatase aanwezig. In volwassen beenbalkjes is vaak in de oppervlakkig in de botbalkjes gelegen osteocyten nog enige alkalische fosfatase activiteit waar te nemen.

In niet ontkalkt bot geven de beenzouten, die voor het grootste deel uit fosfaten bestaan, met de methode van Gomori een fout positieve reactie. Door de vergelijking met de contrôle coupes is toch wel een goede indruk te krijgen van de reële activiteit van alkalische fosfatase.

Duidelijke beelden, met alkalische fosfatase activiteit in de osteoblasten en negatieve botbalkjes, krijgt men als men gebruik maakt van een naphtol-fosfaat als substraat. Zie Hoofdstuk II.

Interne secretie

90 *Schildklier*

Slechts in de endotheelcellen van de kleinere vaten is alkalische fosfatase activiteit te zien. Het colloid is vaak lichtgrijs getint. Dit is ook in de contrôle coupes te zien en ontstaat waarschijnlijk doordat het colloid calcium, resp. cobalt enigszins vasthoudt.

91 *Bijschildklier*

De cellen van het vaatendotheel bevatten alkalische fosfatase, de parenchymcellen zijn negatief.

92 *Thymus*

Ook in dit orgaan is alleen het vaatendotheel positief.

93 *Bijnier*

In schors en merg is in het endotheel van de kleinere vaten activiteit van alkalische fosfatase aanwezig. Bovendien is in het protoplasma van de cellen van de zona fasciculata en van de zona reticularis alkalische fosfatase activiteit waar te nemen (afb. 42b). Er is een geleidelijke toeneming van de activiteit van alkalische fosfatase in de cellen van de zona fasciculata naar de zona reticularis toe. Deze activiteit is in de zona reticularis het hoogst.

94 *Hypofyse*

Slechts in de endotheelcellen van de capillairen is alkalische fosfatase aan te tonen.

HOOFDSTUK IIIc

SYSTEMATISCHE BESCHRIJVING VAN DE ACTIVITEIT VAN ALKALISCHE FOSFATASE IN PATHOLOGISCHE OMSTANDIGHEDEN

De organen en weefsels worden besproken in de volgorde van de coderingslijst van het Pathologisch Laboratorium. Deze lijst is te vinden aan het einde van de illustraties.

Daar de activiteit van alkalische fosfatase bij acuutcellige en chronisch proliferatieve ontstekingsprocessen reeds beschreven is in hoofdstuk IIIa komen wij daarop niet terug. De activiteit van alkalische fosfatase in gezwellen is tezamen met die van zure fosfatase beschreven in hoofdstuk Vb.

Tractus respiratorius

22 *Trachea*

23 *Bronchi*

24 *Long*

Bij chronische prikkeling van het slijmvlies van trachea en bronchi namen wij waar, dat in de basale cellen de activiteit van alkalische fosfatase toenam.

In regenererend epitheel na influenza liggen de cellen, waarin activiteit van alkalische fosfatase aanwezig is, in alle lagen van het epitheel verspreid.

In de alveoli nemen we in normale longen activiteit van alkalische fosfatase waar in de alveolaire epitheelcellen. Doordat deze cellen vlak uitgespreid zijn over de wand van de alveoli en slechts ter plaatse van de kernen meer protoplasma aanwezig is, waarin de activiteit van alkalische fosfatase aanwezig is, lijkt het alsof er slechts enkele alveolaire epitheelcellen in elke alveolus aanwezig zijn. Alleen in de alveoli onder de pleura en in de alveoli rond het bindweefsel van de bronchi zijn de alveolaire epitheelcellen meer cubisch. De activiteit van alkalische fosfatase is hier in de alveolaire epitheelcellen zeer goed te zien.

Bij ontstekingsreacties in de longen, vooral duidelijk bij poststenotische pneumonie, is er

sterke zwelling van de alveolaire epitheelcellen. Het aantal cellen met activiteit van alkalische fosfatase is in deze omstandigheden duidelijk toegenomen.

Tractus digestivus

37 *Maag*

In maagslijmvlies bij chronische gastritis zagen wij enkele malen, in het epitheel in de top van de crypten activiteit van alkalische fosfatase.

44 *Lever*

Het bestudeerde materiaal bestaat voornamelijk uit leverweefsel, dat afkomstig is van obducties en was als volgt samengesteld:

„normale levers"	17
galstuwing	2
cirrhose van Laennec	7
biliaire cirrhose	4
post-hepatitische cirrhose	1
haemostase	6
tumormetastasen	16
primair levercarcinoom	1
extramedullaire haematopoëse	2

In normale levers zijn de galcapillairen te zien als fijne vertakte pijpjes, waarin alkalische fosfatase aanwezig is (afb. 1).

Bij algemene of locale galstuwing zijn de galcapillairen nog duidelijker te zien. Ze zijn dan verwijd, de vertakkingen zijn dan vaak sterker geslingerd. De canaliculi zijn dan niet meer fijne rechte, maar vaak dikkere enigszins knobbelige pijpjes (afb. 2).

Dit is in vele gevallen ook duidelijk te zien bij locale galstuwing rond tumormetastasen. Het blijkt, dat de leverparenchymcellen diffuus een geringe protoplasma activiteit bezitten. Deze komt echter pas duidelijk tot uiting als men het leverweefsel kan vergelijken met metastasen in het leverweefsel van tumoren, die geheel vrij zijn van enzymactiviteit. Bij galstuwing kan men behalve de hogere activiteit in de galcapillairen ook diffuus een sterkere activiteit van alkalische fosfatase waarnemen in de leverparenchymcellen. Soms lijken kleine brokjes in de levercellen aanwezig te zijn met hogere activiteit van alkalische fosfatase.

Bij de gevallen van cirrhose zien we hetzelfde als bij bindweefselvorming in andere organen tijdens chronische ontstekingsprocessen. Het jonge bindweefsel bevat fibroblasten met activiteit van alkalische fosfatase, terwijl in ouder bindweefsel, waar de collageenvorming is beëindigd, activiteit van alkalische fosfatase slechts aanwezig is in het endotheel van de capillairen. Bij de gevallen van cirrhose zijn de galcapillairen steeds duidelijk zichtbaar. Ook bij de cirrhose van L a e n n e c in de regenererende velden leverparenchym zijn de galcapillairen duidelijk zichtbaar. Bij de biliaire cirrhose zijn de galcapillairen vaak sterk uitgezet.

45 *Galblaas*

46 *Galwegen*

De onderzochte galblazen vertoonden alle tekenen van ontsteking. De ontstekingsreacties varieerden van enkele kleine lymfocytaire infiltraten tot uitgebreide fibrose met dichte rondcellige infiltraten. Enkele galblazen waren phlegmoneus ontstoken. De activiteit van alkalische fosfatase bij deze ontstekingsreacties gedroeg zich volgens de aan het begin van dit hoofdstuk gegeven beschrijving.

Het viel ons echter op, dat de activiteit van alkalische fosfatase tegen het oppervlak van het galblaasepitheel in een deel van de gevallen ontbrak. Daar wij de indruk kregen, dat de activiteit van alkalische fosfatase tegen het oppervlak van de epitheelcellen en niet in het protoplasma aanwezig is, veronderstellen we, dat in die gevallen waarin geen activiteit van alkalische fosfatase tegen het celoppervlak was waar te nemen er ook geen alkalische fosfatase in de inhoud van de galblaas aanwezig was. Wij veronderstellen, dat de galblaas in deze gevallen zijn functie als reservoir voor gal verloren heeft. Het lijkt ons de moeite waard na te gaan of er verband bestaat tussen de activiteit van alkalische fosfatase tegen het galblaasepitheel, de activiteit van alkalische fosfatase in de inhoud van de galblaas en de functie van de galblaas als reservoir.

Tractus urogenitalis

59 *Nier*

Menselijk materiaal werd onderzocht door McManus en Mowry (1948). Deze beschreven de activiteit van alkalische fosfatase in nieren bij secties verkregen. Bij de verschillende afwijkingen wisselt de activiteit in de tubuli contorti weinig. Alleen in één geval van shock was de activiteit van het enzym in de gehele buitenste schors verdwenen, in de binnenste schorsdelen intact, wat zij verklaren uit de gewijzigde circulatieverhoudingen. Deze waarneming sluit aan bij de experimenten van Berg (1954, 1955) met clostridium perfringens toxine. Raaschou (1954) paste de histochemische methode voor alkalische fosfatase toe op nierbiopsieën, ook hij zag de wisselende activiteit bij diverse aandoeningen zonder dit uitvoerig te omschrijven, of hieraan conclusies te verbinden.

Het niermateriaal van de mens, dat wij onderzochten, was als volgt samengesteld:

Normale nieren; volwassenen	18
neonati, foeten	5
Chronische, subchronische glomerulonefritis	10
Pyelonefritis	6
Arterio-arteriolosclerose	6
Congenitale cystenieren	3
Nieren bij ziekte van Kahler	2
Tuberculeuze ontsteking	2
Ischaemische necrose	2
Dubbelzijdige schorsnecrose	2
Lupus erythematodes	1
Periarteriitis nodosa	1

De activiteit van alkalische fosfatase in de normale nier is gelocaliseerd in de borstelzoom van de tubuli contorti.

Bij chronische glomerulonefritis, pyelonefritis en arteriosclerose is een aantal nefronen wisselend sterk beschadigd, terwijl andere nog lijken te functioneren. De tubuli, die morfologisch atrofisch zijn, hebben een verminderde activiteit van alkalische fosfatase. In talrijke atrofische tubuli ontbreekt alkalische fosfatase geheel. Men krijgt dus ook uit de waarnemingen in pathologisch veranderde nieren de indruk, dat de activiteit van alkalische fosfatase in de epitheelcellen van de tubuli contorti en de functie van de tubuli contorti parallel loopt.

De beide gevallen van locale ischaemische necrose lieten een geheel verschillend beeld zien. In een vers infarkt was de activiteit van alkalische fosfatase nog aanzienlijk, in een wat ouder infarkt was de activiteit van alkalische fosfatase uit de tubuli verdwenen, echter nog wel aanwezig in de endotheelcellen van de capillairen.

Onze waarnemingen bij dubbelzijdige nierschorsnecrose zijn vermeld in hoofdstuk IIIa.

In congenitale cystenieren, waarbij in de loop van het leven de normale parenchymcellen door de recidiverende ontstekingen worden vernietigd, ziet men in enkele intacte tubuli nog enige alkalische fosfatase activiteit.

Bij patiënten met morbus Kahler, was de activiteit van alkalische fosfatase gering. Er was in beide gevallen een chronische interstitiële ontsteking, terwijl in de tubuli eiwitcylinders werden aangetroffen. In één geval waarin de activiteit van alkalische fosfatase in de tubuli minimaal was, was de patiënt in shock overleden.

Interne secretie

93 *Bijnier*

In de normale bijnier is de hoogste activiteit van alkalische fosfatase aanwezig in de cellen van de zona reticularis. In de zona fasciculata is de alkalische fosfatase activiteit geringer en deze neemt geleidelijk af van de binnenste naar de buitenste lagen (afb. 42b).

In de cellen van de zona glomerulosa is er geen enzymactiviteit zichtbaar te maken. Wel zijn hier de capillairen tussen de cellen sterk positief.

In het onderzochte materiaal zijn een achttal bijnieren, die verwijderd werden bij patiënten met de ziekte van Cushing.

Het morfologisch beeld van deze bijnieren is verschillend. Van sommige bijnieren is de opbouw normaal, alleen het gewicht is te hoog.

In andere bijnieren van patiënten met de ziekte van Cushing is een knobbelige hyperplasie van de zona fasciculata te zien.

In bijnieren met een hyperplastische schors wisselt de activiteit van de alkalische fosfatase in de zona fasciculata vrij sterk. Er zijn onregelmatig verspreid, sterk actieve celstrengen die tot vlak bij de zona glomerulosa reiken, maar tevens wigvormige velden, waarin de cellen geen alkalische fosfatase bevatten.

In bijnieren met hyperplastische noduli liggen naast matig actieve cellen groepen cellen met zeer sterke activiteit van alkalische fosfatase. In de zona glomerulosa zijn de cellen steeds negatief.

Ook als bij de ziekte van Cushing de zona glomerulosa verbreed is, is er geen activiteit van alkalische fosfatase in deze cellen. Wel is er een opvallend sterke activiteit in het vaatendotheel.

In de zona fasciculata liggen de cellen met hoge activiteit van alkalische fosfatase dichter bij de kapsel. Bovendien is opvallend de onregelmatige verdeling van sterk positieve celgroepen in de zona fasciculata (afb. 42a).

De geleidelijke overgang van de kapsel naar het merg ontbreekt. Op grond van de histochemische reacties op alkalische fosfatase krijgt men de indruk, dat er in verhouding meer cellen zijn van het celtype van de zona reticularis.

De totale indruk, die we krijgen, als we de activiteit van alkalische fosfatase bezien in bijnieren van patiënten, die lijden aan de ziekte van C u s h i n g, is die van een verstoring van de opbouw in lagen.

Dit is morfologisch niet steeds even duidelijk. Dit komt vooral tot uiting, morfologisch zowel als histochemisch, in de vorming van noduli, waarin naast elkaar er onregelmatig gerangschikte cellen aanwezig zijn, die de activiteit van alkalische fosfatase laten zien in cellen van de zona fasciculata en cellen die de activiteit van alkalische fosfatase laten zien van cellen van de zona reticularis.

Het blijkt, dat er ook in hyperplastische bijnieren met een morfologisch regelmatige opbouw, in de zona fasciculata groepen cellen liggen, die wat de activiteit van alkalische fosfatase betreft, overeenkomen met cellen van de zona reticularis.

HOOFDSTUK IVa

ZURE FOSFATASE

Inleiding

In dit hoofdstuk worden onze waarnemingen van de activiteit van zure fosfatase besproken. Evenals voor de activiteit van alkalische fosfatase zijn wij in staat algemene regels voor de localisatie van de activiteit van dit enzym in normale omstandigheden te geven. Na deze algemene regels worden enige aspecten van de activiteit van zure fosfatase in pathologische omstandigheden besproken.

De nadruk ligt in dit hoofdstuk echter op ons onderzoek van de activiteit van zure fosfatase in reactieve processen en bij stapeling. Tevens worden enigszins uitvoeriger experimenten beschreven, die gedaan werden om de activiteit van zure fosfatase bij stapeling te kunnen onderzoeken.

Aan het eind van dit hoofdstuk wordt eveneens de activiteit van zure fosfatase in de organen systematisch beschreven, hoofdstuk IVb: De activiteit van zure fosfatase in normaal weefsel, en hoofdstuk IVc: De activiteit van zure fosfatase in pathologische omstandigheden.

Algemene regels voor de localisatie

Als algemene regel voor de localisatie van de zure fosfatase activiteit geldt, dat in alle epitheelcellen activiteit van zure fosfatase is waar te nemen. In parenchymcellen van bijvoorbeeld lever, bijnier, corpora lutea, is de activiteit verspreid in het cytoplasma aanwezig. In epitheelcellen van bijvoorbeeld darm, nier, schildklier, tuba en endometrium is de activiteit vaak het sterkste in het apicale deel van de cel. Slechts plaveiselepitheelcellen bevatten weinig zure fosfatase.

Het is mogelijk op grond van hun zure fosfatase activiteit een zekere indeling te maken tussen de verschillende celtypen.

1. **Cellen met sterke activiteit van zure fosfatase**
   Hieronder vallen de epitheelcellen van de klierbuizen in de prostaat met een zeer sterke activiteit. Iets minder sterk reageren de ganglioncellen in centraal en perifeer zenuwstelsel, ook in paravertebrale en andere autonome ganglia.
   Ook in de cellen van het reticulo-endotheliale systeem en macrofagen in de kliercellen van het mucineuze type, zoals in de wand van de farynx en trachea, en de klieren van Brunner in het duodenum is de activiteit van zure fosfatase hoog.

2. **Cellen met matige activiteit van zure fosfatase**
   In deze groep vallen de epitheelcellen van de tractus digestivus, het epitheel van trachea en bronchi, leverparenchymcellen, de cellen van bijnierschors en -merg, epitheel van de tuba en het endometrium.

3. **Cellen met geringe activiteit van zure fosfatase**
   In spiercellen, fibrocyten, vaatendotheelcellen en plaveiselepitheelcellen is de activiteit van zure fosfatase minimaal.

Op deze plaats dient echter een mogelijke bron van fouten vermeld te worden. De activiteit van zure fosfatase in de epitheelcellen van de dunne darm is het sterkst in het gebied apicaal van de kern. De alkalische fosfatase is in hetzelfde deel van de cellen gelocaliseerd. Ook in de borstelzoom lijkt activiteit van zure fosfatase gelocaliseerd te zijn. Een deel hiervan berust echter op de zeer sterke activiteit van alkalische fosfatase in dit gebied. Dit is onderzocht door Burt c.s. (1957), die darmcoupes incubeerde met fluoride, een inactivator van zure fosfatase. In darmcoupes, waarin de zure fosfatase op deze wijze was geïnactiveerd, ontstond toch bij pH 5.0 nog een duidelijke neerslag in de borstelzoom van de epitheelcellen. Waarschijnlijk berust dit erop, dat de alkalische fosfatase in de borstelzoom van de darm ook bij pH 5.0 nog in staat is enig glycerofosfaat te splitsen (Burt c.s. 1957).

Men dient zich dus wel af te vragen of een neerslag, dat ontstaat bij de histochemische reactie op zure fosfatase op plaatsen, waar sterke activiteit van alkalische fosfatase bestaat, niet berust op de activiteit van dit enzym bij de niet optimale pH 5.0. Men moet hierom steeds de activiteit van beide enzymen onderzoeken en vergelijken.

De activiteit van zure fosfatase en stapelprocessen

Bij het bewerken van het materiaal zagen wij dus hoge activiteit van zure fosfatase in de volgende typen cellen:

A. Cellen die deel uitmaken van het reticulo-endotheliale systeem, zoals de reticulumcellen in de thymus (IV, 92), de milt (IV, 18) en de lymfeklieren (IVb, 17) (afb. 45), de stercellen van K u p f f e r in de lever (IVb, 44) (afb. 11).

B. Macrofagen, overal waar deze een rol spelen bij het verwerken of opslaan van stoffen van verschillende aard. Voorbeelden van zure fosfatase activiteit in macrofagen zijn o.a.:

1. Alveolaire fagocyten in de alveoli van de longen (IVc, 24), zoals men ze vindt bij ontstekingsprocessen, maar ook bij longoedeem en bij chronische longstuwing met recidiverende bloedinkjes (afb. 43).
   Deze macrofagen bevatten vaak vetachtige stoffen en bij longstuwing haemosiderine.
2. Macrofagen in het ovarium rondom resten van corpora lutea (IVc, 60). Deze macrofagen bevatten een pigment, dat de eigenschappen bezit van lipofuscine en ceroid (afb. 44).
3. Macrofagen bij etterige ontstekingen, die dan regelmatig verspreid in en rond het leucocytair infiltraat te vinden zijn (IVc, 42).
4. Macrofagen in het stroma van gezwellen (Vb) (afb. 26, 30, 36, 37).
5. Histiocyten (ook de cellen van een histiocytoom) (Vb, 80) (afb. 31).
6. Alle typen reuzencellen en wel:
   a. vreemdlichaamreuzencellen, rond hechtingsmateriaal, rond uraatkristallen in jichtknobbels (IVc, 82) (afb. 50, 51).
   b. reuzencellen van het type L a n g h a n s bij tuberculeuze ontstekingsprocessen (IVc, 24) (afb. 47).
   c. reuzencellen in granulomen van A s c h o f f bij acuut rheuma (IVc, 11) (afb. 48).
   d. osteoclasten (IVb, 89).
   e. reuzencellen in verscheidene gezwellen van het bot; zoals in het fibroma gigantocellulare (afb. 41), osteoblastoma benignum (Vb, 89).
   f. reuzencellen van S t e r n b e r g-R e e d in de granulomen bij de ziekte van H o d g k i n (Vb, 17, 18).

g. reuzencellen die men vindt bij chronische granulomateuze thyreoiditis (type Quervain), (IVc, 90) (afb. 46).

Het gemeenschappelijk kenmerk van deze cellen is, dat ze bepaalde substanties gestapeld hebben of in staat zijn tot stapelen.

Niet in alle genoemde reuzencellen is de gestapelde stof aan te tonen. Een deel van deze cellen ontstaat echter bij reactieve processen uit macrofagen, zodat voor al deze cellen met hoge activiteit van zure fosfatase een verband met fagocyten en het stapelen van de opgenomen stoffen lijkt te bestaan.

Op grond van deze waarnemingen hebben we ons afgevraagd, of het enzym zure fosfatase een rol speelt bij opneming en/of verwerking, en in hoeverre een antwoord op deze vraag verkregen kan worden door middel van experimenten. Wij hebben daarom overwogen welke stapelstoffen geschikt zouden zijn om gebruikt te worden bij experimenten, waarbij het verband tussen stapelen en activiteit van zure fosfatase onderzocht kan worden.

Zo'n stof mag niet of nauwelijks in het organisme worden gemetaboliseerd en moet zelf bij voorkeur niet te donker gekleurd zijn. Als de stof wordt omgezet kunnen wij deze niet meer goed localiseren, bovendien weten wij dan niet of de toeneming van activiteit van zure fosfatase een uiting is van een adaptie van de celstofwisseling aan het substraat, of dat zure fosfatase van belang is voor de stapeling zelf. De gestapelde stof mag niet te donker gekleurd zijn, na fagocytose van bijvoorbeeld koolstofdeeltjes is het moeilijk om in de cellen, die deze zwarte partikels hebben opgenomen, de zure fosfatase activiteit, die tot uitdrukking komt in de dichtheid van het zwartbruine loodsulfideneerslag, te beoordelen.

Een stof, die aan deze voorwaarden voldoet, is het polysaccharide dextraan. Dextraan wordt bereid uit bacteriën. Het is verkrijgbaar in gedeeltelijk afgebroken vorm als een 6% oplossing in 0,9% NaCl onder de naam Macrodex bij Poviet Producten N.V. Amsterdam.

Macrodex wordt in de kliniek als plasma-substituut gebruikt. Het moleculair gewicht van het dextraan in deze oplossing is gemiddeld 75.000. Het is bekend, dat dextraan in het dierlijk organisme wordt gestapeld. Mowry en Millican (1953) hebben een uitvoerig onderzoek verricht om na te gaan waar dextraan, dat intraperitoneaal bij muizen werd ingespoten, bleef. Een belangrijk deel van het ingespoten dextraan (± 30%) wordt door de nier uitgescheiden. Na een enkele injectie van 1 ml van een 6% dextraanoplossing in 0,9% NaCl, bleek voornamelijk de lever dit dextraan te hebben gestapeld. Het dextraan was aanwezig in de leverparenchymcellen en in de Kupffercellen.

Maar ook in macrofagen in andere organen was dextraan aan te tonen. Het dextraan verdween vrij snel uit de parenchymcellen van de lever: 24 uur nadat de dieren met dextraan waren ingespoten, was het meeste dextraan uit de levercellen verdwenen. Er was slechts in de cellen van Kupffer evenals in macrofagen in andere organen nog dextraan aanwezig. In deze macrofagen waren resten van het gestapelde dextraan terug te vinden tot drie maanden na de injectie van het dextraan.

Dextraan wordt in het dierlijk organisme heel langzaam afgebroken. Indien men muizen inspuit met dextraan, dat gemerkt is met C^{14}, wordt een klein deel van dit C^{14} teruggevonden als $C^{14}O_2$ in de uitgeademde lucht (Cargill en Brunner, 1951). Dit behoeft nog geen bewijs te zijn voor een afbraak van dextraan door de muis, daar Engstrand en Åberg (1950) aan konden tonen, dat dextraan in de maag wordt uitgescheiden, in de faeces echter niet meer aanwezig is, zodat de darmbacteriën eventueel het dextraan afgebroken kunnen hebben.

Dextraan is kleurloos, zodat de beoordeling van de zure fosfatase activiteit in de cellen waar het gestapeld wordt, niet bemoeilijkt wordt. Dextraan is in water oplosbaar, zodat het uit de cellen verdwijnt, indien waterige fixatievloeistoffen gebruikt worden. Door het weefsel in alcohol of in aceton te fixeren, zoals voor de fosfatasetechniek al gedaan wordt, kan bereikt worden dat het dextraan blijft liggen in de cellen, waarin het was opgenomen. Bovendien is het mogelijk om dit dextraan histochemisch aan te tonen en te localiseren met behulp van een gewijzigde perjoodzuur-Schiff-techniek volgens Mowry en Millican. Hierbij moet wel de voorzorg genomen worden, dat de coupes niet met waterige oplossingen in aanraking gebracht worden. De paraffinecoupes moeten droog op een met eiwitoplossing ingesmeerd objectglas worden geplakt. Na deparaffineren in xyleen, worden de coupes in absolute alcohol gespoeld en daarna in een 1% oplossing van perjoodzuur in 90% alcohol gebracht. In polysacchariden kunnen door inwerking van perjoodzuur, twee aanliggende hydroxylgroepen tot aldehydegroepen worden geoxydeerd. Met het Schiff's reagens wordt dan aan de aldehydegroepen een rode kleurstof gekoppeld. Na de perjoodzuuroxydatie ontstaat een in water onoplosbaar oxydatieproduct. zodat het waterige Schiff's reagens bruikbaar is.

Het volledige voorschrift voor de alcoholische perjoodzuur-Schiff-reactie is als volgt (Mowry, Millican 1953):

1. weefselstukjes fixeren in absolute alcohol of in aceton.
2. doorvoeren via petroleumaether naar paraffine.

3. coupes droog op objectglazen brengen, warm strekken.
4. deparaffineren, spoelen in absolute alcohol.
5. 2 uur in een verse oplossing van 1% perjoodzuur in 90% alcohol (1 gram perjoodzuur oplossen in 10 ml aqua dest., dan aanvullen tot 100 ml met absolute alcohol en filtreren door een glasfilter).
6. spoelen in alcohol 80% — doorvoeren naar water.
7. 10 minuten waterige S c h i f f-oplossing.
8. 2 x 5 minuten spoelen in SO_2 water, daarna 2 x 5 minuten in kraanwater.
9. desgewenst kernkleuring met haematoxyline.
10. oplopende alcoholen, xylol, afdekken met canadabalsem.

In plaats van het S c h i f f's reagens kan men ook het aldehyde reagens volgens V a n D u i j n (1956) gebruiken. Dit is een oplossing van thionine-SO_2 in een mengsel van tertiaire butylalcohol en water. Het dextraan wordt na perjoodzuuroxydatie hiermee blauw gekleurd in plaats van rood, zoals met het S c h i f f's reagens.

Om de aanwezigheid van glycogeen uit te sluiten, moeten steeds ook coupes meegekleurd worden, die aan de werking van amylase zijn blootgesteld.

Wij besloten dextraan te gebruiken om te onderzoeken of er verband tussen zure fosfatase en stapeling was aan te tonen. De experimenten waren als volgt ingericht:

G r o e p A: Muizen werden gedurende 9 dagen dagelijks intraperitoneaal ingespoten met 1 ml Macrodex, volgens M o w r y en M i l l i c a n.

De muizen die wij gebruikten waren jonge witte muizen uit eigen voorraad. Na de laatste injectie lieten wij de muizen 16 uur vasten en vervolgens werden de muizen gedood. Door het vasten verdwijnt het meeste glycogeen uit de lever, zodat de histochemische beoordeling van de hoeveelheid van het gestapelde dextraan eenvoudiger wordt. Als contrôle werden verschillende groepen muizen onderzocht.

G r o e p B: Muizen, die geen injecties ontvingen, maar wel 16 uur voor hun dood gevast hadden.

G r o e p C: Muizen, die geen injecties ontvingen en die ook niet gevast hadden.

G r o e p D: Muizen, die gedurende 9 dagen intraperitoneaal ingespoten werden met 1 ml 0,9% NaCl en die wel gevast hadden voor hun dood.

Elke groep muizen bestond uit tenminste vijf dieren. Van deze dieren werden lever en milt histochemisch onderzocht.

In de coupes van de levers van muizen, die ingespoten waren met dextraan, zagen wij in de cellen van Kupffer een sterke stapeling van dextraan als grove, soms bijna kristallijne bollen.

Tevens was er dextraan waar te nemen in de levercellen, in de vorm van kleine korrels, vaak rond de galcapillairen. Door deze ophoping rond de galcapillairen ontstaat een kenmerkend patroon van rijen dextraankorrels centraal in de levercelbalkjes, onderbroken door de kernen van de levercellen. Dit patroon komt overeen met het patroon van de haemosiderine stapeling in de lever van de mens bij primaire- en secundaire haemosiderosis. In de milten van muizen, die ingespoten waren met dextraan, zagen wij een sterke stapeling in de reticulumcellen. De reticulumcellen, die met dextraan gevuld waren, lagen vooral dicht opeen rond de follikels. In de follikels zelf waren slechts enkele reticulumcellen met dextraan gevuld. Ook deze verdeling is ongeveer gelijk aan de verdeling die wij zien bij stapeling van haemosiderine in de reticulumcellen van de milt bij de mens.

Onder normale omstandigheden (groep C) is in de lever van de muis een sterke activiteit van zure fosfatase waar te nemen in de cellen van Kupffer en slechts een geringe activiteit in de leverparenchymcellen (afb. 52). Deze zelfde verdeling van de activiteit van zure fosfatase zagen wij in de andere contrôlegroepen (B en D). In de levers van de met dextraan ingespoten muizen (groep A) was de activiteit van zure fosfatase in de gezwollen cellen van Kupffer zeer sterk in het gehele cytoplasma van deze cellen. Bovendien was er een sterke activiteit van zure fosfatase in leverparenchymcellen waar te nemen (afb. 53). De verdeling van de activiteit van dit zure fosfatase in de levercellen was dezelfde als de verdeling van het gestapelde dextraan. In de milt is bij de contrôledieren een sterke activiteit van zure fosfatase waar te nemen in de reticulumcellen. Na stapeling van dextraan was de verdeling van reticulumcellen met een hoge activiteit van zure fosfatase dezelfde. De reticulumcellen waren echter gezwollen en de enzymactiviteit was te zien in het gehele cytoplasma van deze gezwollen cellen.

Daar bij de dieren uit de contrôlegroepen in de cellen van Kupffer in de lever en in de reticulumcellen van de milt reeds een sterke activiteit van zure fosfatase bestond, was het vaak moeilijk uit te maken of er in deze cellen na stapeling van dextraan een toeneming van enzymactiviteit was opgetreden. Deze toeneming was echter duidelijk waar te nemen in de parenchymcellen van de lever. Indien er geen dextraan in de levercellen aanwezig was, was de

activiteit van zure fosfatase gering. Terwijl parallel met de stapeling van dextraan op dezelfde plaats waar dit dextraan opgeslagen wordt, een hoge activiteit van zure fosfatase ontstond.

Om deze kwalitatieve gegevens, verkregen door histochemisch onderzoek, met kwantitatieve gegevens te kunnen correleren werd in homogenaten van levers van deze muizen de activiteit van zure fosfatase bepaald (Van Duijn, Willighagen, Meyer, 1959).

In verschillende experimenten werd een toeneming gevonden in de homogenaten van levers van muizen, die ingespoten waren met dextraan. De gevonden waarden varieerden van twee tot drie maal de waarden die gevonden werden in de homogenaten van de levers van contrôlemuizen. De waarnemingen die gedaan werden bij één van deze experimenten zijn in onderstaande tabel IVa1 vermeld (Van Duijn, Willighagen, Meyer, 1959).

TABEL IVa1

Activiteit van zure fosfatase in leverhomogenaten van muizen, die met dextraan werden ingespoten en contrôlegroepen

groep	activiteit van zure fosfatase g P / mg N / uur
A dextraan	176 ± 35
B contrôles (gevast)	95 ± 14
C contrôles (niet gevast)	78 ± 12
D 0,9% NaCl	98 ± 8
E periston	141 ± 12

Uit onze experimenten blijkt dus, dat er in de levers van muizen na stapeling van dextraan een stijging is van de activiteit van zure fosfatase. Bij microscopisch histochemisch onderzoek zien wij deze toeneming duidelijk in de levercellen. De uitkomsten van deze experimenten zijn dus in overeenstemming met onze hypothese, dat zure fosfatase een rol speelt bij de stapeling van stoffen in cellen.

Daar een klein deel van het dextraan mogelijk in de lever afgebroken wordt (zie boven), bestaat de mogelijkheid dat de zure fosfatase een rol speelt bij de afbraak van deze stof.

Om deze mogelijkheid uit te sluiten, hebben wij gezocht naar een stof die evenals dextraan gestapeld wordt en die eveneens niet door een intensieve eigen kleur het beoordelen van de zure fosfatase activiteit stoort. Polivinyl

pyrollidon (P.V.P.) voldoet aan deze voorwaarden. Deze stof wordt evenals dextraan gebruikt als plasma vervangingsmiddel en is als 6% oplossing in 0,9% NaCl onder de naam Periston Bayer in de handel. Het P.V.P. is een synthetisch polymeer en heeft een gemiddeld moleculair gewicht van 12.000 of 18.000.

Het experiment waarbij gebruik gemaakt werd van P.V.P. als stapelstof, werd op dezelfde wijze opgezet als het experiment waarbij dextraan gebruikt werd. Naast de groepen A, B, C en D, werd een vijfde groep muizen (E) met Periston ingespoten. Gedurende 9 dagen werden de muizen intraperitoneaal ingespoten met 1 ml. Deze muizen lieten wij eveneens 16 uur voor hun dood vasten. Het is ons niet gelukt het gestapelde polivinyl pyrollidon histochemisch in de coupes aan te tonen. Wel zagen wij na inspuitingen met Periston histochemisch eveneens een duidelijke toename van de zure fosfatase activiteit in de levercellen. Deze stijging was minder sterk dan na inspuitingen met dextraan.

Deze toeneming is echter zo karakteristiek, dat het mogelijk blijkt op grond van de activiteit van zure fosfatase, in de coupes, te herkennen of de muis ingespoten was met dextraan, met Periston of met geen van beide.

De toeneming van zure fosfatase activiteit, zoals deze blijkt uit de biochemische bepalingen in de homogenaten van de levers van deze muizen, is eveneens minder sterk dan na inspuitingen met dextraan.

De gegevens van de biochemische bepalingen zijn in de tabel IVa1 samengevat, samen met de uitkomsten van het vorige experiment.

De experimenten met P.V.P. maken het dus minder waarschijnlijk, dat de stijging van de activiteit van zure fosfatase in de levercellen uitsluitend in verband staat met de afbraak van gestapelde stoffen.

Andere muizen werden ingespoten met Intrafer (Dagro), dat 20 mg ijzer in de vorm van ferrisaccharaat per ml bevat.

Indien men muizen intraperitoneaal ijzer inspuit, dan vindt men dit ijzer terug in de cellen van Kupffer in de lever, in de reticulumcellen in de milt, maar tevens in de leverparenchymcellen. Het stapelingspatroon is identiek aan het patroon, dat men vindt bij patiënten, die lijden aan primaire of secundaire haemosiderosis. Het ijzer wordt bij de muis eveneens in de vorm van haemosiderine afgezet. Bij verscheidene muizen, die met Intrafer waren ingespoten, zagen wij bovendien tegen de lever- en miltkapsel ophopingen van macrofagen, die geheel gevuld waren met haemosiderine. In alle cellen waar haemosiderine aanwezig is, neemt men eveneens een hoge activiteit van zure fosfatase waar.

Uit al deze experimenten blijkt, evenals uit de reeds vermelde waarnemingen in het menselijk weefsel, dat er een verband bestaat tussen stapelen en activiteit van zure fosfatase. Het is echter niet geheel duidelijk in welke fase van het stapelingsproces de zure fosfatase een rol speelt.

Wanneer materiaal wordt opgestapeld in de cel, moet dit eerst de celmembraan gepasseerd zijn. Dit proces noemt men, indien het zichtbare deeltjes betreft fagocytose (Hirsch 1956). Indien het deeltjes betreft, die kleiner zijn dan 1 μ, spreekt men van pinocytose. Wanneer het opgenomen materiaal in de cellen opgeslagen wordt, spreekt men van stapelen. De cel, die gestapeld heeft, tracht dit gestapelde materiaal te verwijderen. Indien deze stof zoals dextraan en Periston in water oplosbaar is, wordt hij aan het bloed afgegeven en uiteindelijk door de nier uitgescheiden. Andere stoffen zoals koolstofpartikels en silicaatdeeltjes kunnen echter niet uitgescheiden worden. Men vindt bij mens en dier de koolstofpartikels onveranderd terug in de reticulumcellen van lymfeklieren. Silicaatdeeltjes geven echter aanleiding tot chronische proliferatieve ontstekingen, met veel reuzencellen waarin steeds hoge activiteit van zure fosfatase is waar te nemen.

Men kan de vraag, in welke fase van de stapeling zure fosfatase een rol speelt, benaderen door het proces van de stapeling op verschillende tijdstippen te onderzoeken. Daartoe werd de activiteit van zure fosfatase in de lever vergeleken met de hoeveelheid gestapeld dextraan, nadat deze muizen slechts éénmaal ingespoten waren met 1 ml 6% dextraan in 0,9% NaCl. De muizen werden ½ uur, 1, 2, 4, 8, 18, 24, 48en 72 uur na de injectie gedood. Voordat de muizen gedood werden hadden ze 16 uur gevast. Bovendien werden de levers van muizen onderzocht, waarbij in de plaats van 1 ml dextraan intraperitoneaal, 0,2 ml dextraan intraveneus ingespoten werd. Ook deze muizen hadden, voordat ze gedood werden, 16 uur gevast.

De resultaten zijn samengevat in onderstaande tabellen IVa2 en IVa3.

Het blijkt uit dit experiment, dat bij het intraveneus toedienen van een hoeveelheid dextraan, die een vijfde bedraagt van de hoeveelheid die intraperitoneaal wordt ingespoten eveneens een stijging van de activiteit van zure fosfatase optreedt. Zowel na injectie van 1 ml 6% dextraan intraperitoneaal, als na injectie van 0,2 ml 6% dextraan intraveneus, nemen wij de stijging van de activiteit van zure fosfatase in de levercellen waar.

Na intraperitoneale inspuiting (tabel IVa2) nemen wij het eerst in de cellen van Kupffer een diffuse verdeling van het opgenomen dextraan waar. Dit is reeds ½ uur na de injectie te zien. Een uur nadat het dextraan is ingespoten,

TABEL IVa2

Activiteit van zure fosfatase in muizelevers na intraperitoneale injectie van 1 ml 6% dextraan in physiologisch zout

uren	zure fosfatase in leverparenchymcellen	dextraan in parenchymcellen	dextraan in Kupffercellen
0	±	–	
½	±	–	+ (diffuus)
½	±	+ (enkele cellen, diffuus)	+
1	±	+ (enkele cellen, diffuus)	+
1	±	2+ (fijn verdeeld)	+
2	+		
4	+ *)	2+ (grof druppelig)	2+
4	+ *)	+ (diffuus)	2+
		3+ (enkele cellen)	
8	+ *)	2+ (diffuus grof druppelig)	3+
8	+ *)	2+ (diffuus grof druppelig)	3+
24	3+	2+ (fijn verdeeld)	3+
24	2+	5+	>4+
2×24	3+	3+	4+
2×24	2+	3+	4+
3×24	3+	3+	4+
3×24	2+	3+ (fijn verdeeld)	2+

*) Kupffercellen vallen op door hoge activiteit van zure fosfatase.

zien we het dextraan als grotere en kleinere afgeronde korrels in de cellen van Kupffer liggen. De hoeveelheid gestapeld dextraan neemt in de loop van de volgende uren toe, om een maximum te bereiken na 48 tot 72 uur na het tijdstip van injectie.

Als we de stapeling in de leverparenchymcellen volgen, dan zien we een uur na de injectie het dextraan in de parenchymcellen. Het dextraan is slechts in kleine groepjes van 3 à 6 bij elkaar gelegen cellen aanwezig en ligt diffuus verdeeld in het cytoplasma. Twee uur na het tijdstip van de injectie nemen we dextraan in fijngekorrelde vorm waar en zijn de korrels reeds gelocaliseerd tussen kern en galcapillairen. Het maximum van deze stapeling ligt eveneens ongeveer 48 tot 72 uur nadat het dextraan is ingespoten.

Na intraveneuze inspuiting (tabel IVa3) is reeds na een ½ uur in de cellen van Kupffer en in de parenchymcellen van de lever het dextraan als gekor-

TABEL IVa3

Activiteit van zure fosfatase in muizelevers na intraveneuze injectie van 0.2 ml 6% dextraan in physiologisch zout

uren	zure fosfatase in leverparenchymcellen	dextraan in parenchymcellen	dextraan in Kupffercellen
0	±		
½	±	+ (fijn verdeeld); 2+ (enkele cellen)	+
½	±	+ (fijn verdeeld)	+
1	±	+ (fijn verdeeld)	+
1	+	+ (fijn verdeeld)	+
2	+	2+ (fijn verdeeld)	+
2	+	+ (fijn verdeeld)	+
4	+	+ (fijn verdeeld)	+
4	+ *)	+ (fijn verdeeld)	3+
8	2+	5+	>4+
8	+	2+ (fijn verdeeld)	2+
18	+	5+	>4+
18	+	5+	>4+
24	3+	5+	>4+
24	2+	2+ (fijn verdeeld)	+
2×24	3+	2+ (fijn verdeeld)	3+
2×24	2+		
3×24	3+	2+ (fijn verdeeld)	+

*) Kupffercellen vallen op door hoge activiteit van zure fosfatase.

relde neerslagen te herkennen. Wij veronderstellen, dat het stadium van de diffuse verdeling van het dextraan reeds eerder lag. Het tijdstip waarop het maximum van de stapeling bereikt wordt in de levercellen en de cellen van Kupffer, ligt na intraveneuze injectie tussen 8 en 24 uur.

Indien we nu de activiteit van zure fosfatase vergelijken met de hoeveelheid gestapeld dextraan, dan zien wij, dat na een enkele injectie intraperitoneaal of intraveneus een duidelijke toeneming van activiteit van zure fosfatase optreedt. Deze stijging van activiteit van zure fosfatase in de leverparenchymcellen, nemen we na intraperitoneale injectie 2 uur (tabel IVa2), na intraveneuze injectie 1 à 2 uur (tabel IVa3) na de injectie waar.

In beide gevallen is dit dus ± 1 uur nadat het dextraan het eerst in de lever-

parenchymcellen is aan te tonen. Zowel na intraperitoneale als na intraveneuze inspuiting ligt het maximum van de activiteit van zure fosfatase 24 uur na het tijdstip van de injectie.

Uit dit experiment krijgen we de indruk, dat zure fosfatase geen rol speelt bij de opname van dextraan in de cellen, maar dat de verhoging van de activiteit van zure fosfatase pas optreedt, als dextraan in de vorm van korrels in het protoplasma aanwezig is.

Duidelijk konden wij dit ook waarnemen na onderhuidse inspuitingen van een oplossing van fluorescerend bovine albumine bij caviae (Oort 1960). Reeds na 6 tot 12 uur zijn de fluorescerende eiwitten met de fluorescentiemicroscoop in macrofagen aan te tonen. Duidelijke zure fosfatase activiteit zagen wij echter pas 24 uur na de injecties. Ook hieruit blijkt, dat het waarschijnlijker is dat er verband bestaat tussen de zure fosfatase activiteit en het stapelen of verwerken in de cel van het opgenomen materiaal, dan dat zure fosfatase van belang is voor het opnemen ervan. Voor deze veronderstelling zijn verscheidene andere argumenten aan te voeren. Een zelfde latentietijd werd ook waargenomen door Mathiesen (1955) en Gedigk en Pioch (1956) in macrofagen en reuzencellen, die ontstaan na onderhuidse inspuitingen met fijn verdeeld silicaat.

Over de rol van zure fosfatase in het metabolisme van de cel is nog weinig bekend. Onderzoekingen van De Duve e.a. (1956) met gefractionneerde celbestanddelen hebben aangetoond, dat zure fosfatase, samen met enkele andere hydrolytische enzymen, zoals cathepsine, glucuronidase, desoxyribonuclease, ribonuclease en arylsufatase in een afzonderlijk te centrifugeren fractie voorkomen. De deeltjes in deze fractie zijn lichter dan de mitochondriën en zwaarder dan de microsomen fractie. De Duve noemt deze deeltjes lysosomen, omdat in deze deeltjes een aantal lytische enzymen tezamen aanwezig zijn.

Uit cytochemische experimenten is duidelijk geworden, dat deze lysosomen een semi-permeabele membraan bezitten, die op analoge manier als de membraan van erthyrocyten, bijv. door bevriezen en opdooien, door inwerking van vetoplossende middelen of van hypotonische zoutoplossingen, te beschadigen is. De Duve (1956) veronderstelt, dat de hydrolytische enzymen in de lysosomen een rol spelen bij necrose en autolyse. Hij neemt aan, dat bijvoorbeeld onder anoxie er een verandering van de pH in het cytoplasma zou plaats vinden die de lysosoommembraan beschadigt. De hydrolytische enzymen uit deze deeltjes zouden als gevolg hiervan vrij komen. Het vrijkomen van deze enzymen zou de dood van de cel inluiden, vandaar de naam „suicide bags"

voor deze lysosomen. Bij onderzoek met de electronenmicroscoop van fracties van ultracentrifugaten, die rijk zijn aan lysosomen, neemt men corpusculaire deeltjes waar, die een typisch aspect hebben. Het zijn deeltjes met een doorsnee van 0.20-0.40 μ, die sterk electronen strooien en waarin vaak 1 of 2 vacuolen aanwezig zijn.

Bij onderzoek met de electronenmicroscoop van levercoupes, vindt men deze lysosomen vooral rond de galcapillairen. Op deze plaats vindt men histochemisch ook de activiteit van zure fosfatase, mits men onder optimale omstandigheden werkt.

Er bestaat dus overeenstemming in de localisatie van de activiteit van zure fosfatase in de leverparenchymcellen en de localisatie van de met de electronenmicroscoop als lysosomen te herkennen deeltjes. Bovendien vindt men in de leverparenchymcellen op dezelfde plaats de afzetting van lipofuscine en in gevallen van ijzerstapeling, haemosiderine. Ook in onze experimenten met muizen zien we de dextraanophopingen voornamelijk in dit gebied liggen. Er lijkt dus een relatie te bestaan tussen stapeling en de lysosomen.

Bennett (1956) wijst op de opvallende morfologische overeenkomst van lysosomen met de ,,dense bodies" die met de electronenmicroscoop bij fagocytose en pinocytose in macrofagen kunnen worden gezien. Deze ,,dense bodies" vindt men in afbeeldingen van onderzoekingen met de electronenmicroscoop steeds weer terug. In de cellen, waar deze ,,dense bodies" voorkomen en onder de omstandigheden waarin deze structuren optreden is steeds activiteit van zure fosfatase aan te tonen. Dit kan aan de hand van enkele voorbeelden worden toegelicht.

Palade (1955) laat electronenmiscroscopische afbeeldingen zien van dit soort ,,dense bodies" in macrofagen in de milt.

Odor (1956) ziet na pinocytose van colloidaal kwiksulfide en thoriumoxyde, dat deze stoffen worden opgenomen in afgeronde lichaampjes, die hetzelfde morfologische aspect hebben als ,,dense bodies".

Gedigk (1956) nam na injecties van metaalzouten op de plaats waar deze metalen gestapeld worden, steeds activiteit van zure fosfatase waar.

Gedigk c.s. (1954, 1956) onderzocht bovendien histochemisch het reactieproduct dat ontstaat na stapeling van verschillende metaalzouten, o.a. Fe, Cu, Pb. Het blijkt, dat deze metalen in cellen, waarin ze worden opgenomen, gebonden worden aan bepaalde, histochemisch karakteristieke deeltjes. Deze deeltjes zijn PAS-positief, ook de eiwitreacties zijn positief en bovendien bevatten ze enig met Sudan Black aantoonbaar vet. Ook als fijn verdeelde silicaten onderhuids worden ingespoten, worden deze silicaatdeeltjes in de macrofagen

omhuld door hetzelfde materiaal, waarvan Gedigk (1956) op grond van deze histochemische reacties veronderstelt, dat het lipoglycoproteiden zijn.

Gedigk (1956) toonde in de macrofagen, die ontstaan in silicaatgranulomen, bovendien de activiteiten van andere hydrolytische enzymen aan, zoals β-glucuronidase, esterase en fosfoamidase. Cytochroom oxydase en barnsteenzuurdehydrogenase kon hij echter in de macrofagen niet aantonen.

Andere onderzoekingen die verband leggen tussen fagocytose en zure fosfatase zijn van Straus (1954, 1956, 1958, 1959). Het uitgangspunt van deze onderzoekingen zijn de eiwitkorrels, die ontstaan in de tubuli contorti van de ratten na intraperitoneale inspuiting van kippeneiwit. Bij gefractionneerde centrifugatie van gehomogeniseerde nierschors zijn verscheidene fracties te onderscheiden. In deze fracties zijn korrelgrootten te onderscheiden van 0,5-1 tot 5 μ toe. Vooral in de fractie met de grootste korrels is de zure fosfatase activiteit hoog. Straus kon eveneens de aanwezigheid van andere hydrolytische enzymen, zoals β-glucuronidase, desoxyribonuclease en ribonuclease aantonen.

Bij histochemisch onderzoek van menselijke nieren zagen wij bij te sterke terugresorptie van eiwit, zoals bij verschillende nefropathiën het geval kan zijn, verhoogde activiteit van zure fosfatase in de tubuli contorti. Het betreft dan vooral de tubuli contorti van de tweede orde.

Straus (1958, 1959) breidde zijn onderzoek uit door als eiwit een gezuiverde plantaardige peroxydase in te spuiten. Hij nam daarbij waar, dat in de weefsels waar de meeste peroxidase wordt opgenomen, ook de sterkste activiteit van zure fosfatase is aan te tonen. Op grond van zijn onderzoekingen meent hij, dat de deeltjes, die zure fosfatase en andere hydrolytische enzymen bevatten, een functie hebben bij het opnemen van stoffen in de cel. Hij stelt voor deze deeltjes phagosomen te noemen.

Op grond van deze gegevens was het interessant om met het electronenmicroscoop leverweefsel van muizen, die ingespoten zijn met dextraan, te onderzoeken. Het zou misschien mogelijk zijn om op deze wijze een verband aan te tonen tussen de stapeling van dextraan en dense bodies.

Bij onderzoek met de electronenmicroscoop van leverweefsel van muizen, nadat deze intraperitoneaal met dextraan zijn ingespoten, blijken in de levercellen en in de cellen van Kupffer, afgeronde blazige vormsels aanwezig te zijn (De Man, Willighagen, Daems, 1960).

Er lijkt bovendien een relatie te bestaan met „electron dense bodies" resp. lysosomen of phagosomen.

Op grond van onze waarnemingen en van de gegevens, die uit de literatuur

zijn te verkrijgen, stellen we ons de gang van zaken bij het proces van de fagocytose, resp. pinocytose als volgt voor:

Het materiaal, dat wordt opgenomen in de cel, passeert eerst de celmembraan en komt dan in het cytoplasma. Indien dit materiaal dextraan is, dan kunnen we waarnemen, dat dit dextraan gedurende korte tijd diffuus verdeeld is over het cytoplasma.

In het cytoplasma wordt het materiaal vervolgens opgenomen in vacuolen. Op de plaats van deze vacuolen ontstaat activiteit van zure fosfatase. Soms vindt men bij onderzoek met de electronenmicroscoop op deze plaats ,,dense bodies" met het typisch aspect van lysosomen. Men kan echter inplaats van ,,dense bodies" ook andere structuren waarnemen. De vorm is volgens Schultz (1957) afhankelijk van de aard van het gestapelde materiaal. Indien dextraan gestapeld wordt, vindt men door een membraan omgeven vacuolen, die soms in nauw verband liggen met mogelijke prae-existente ,,dense bodies". Mogelijk hebben de typische ,,dense bodies" histochemisch de eigenschappen van lipoglycoproteiden, die zoals Gedigk aantoonde, ontstaan bij stapeling van metalen en silicaat.

De activiteit van zure fosfatase en celfunctie

Evenals de activiteit van alkalische fosfatase ons de mogelijkheden biedt om de functietoestand van een orgaan te beoordelen, vinden wij deze mogelijkheden bij het bestuderen van de activiteit van zure fosfatase onder verschillende omstandigheden.

In het voorgaande deel van dit hoofdstuk hebben wij aangetoond, dat in cellen, die stapelen, de activiteit van zure fosfatase verhoogd is. De activiteit van dit enzym is dus te gebruiken als aanwijzing voor de stapelende functie van deze cellen. Indien we in de tubuli contorti van nieren een verhoogde activiteit van zure fosfatase vinden nemen wij aan, dat een verhoogde terugresorptie van eiwitten heeft plaats gehad (afb. 54). Dit is een aanwijzing voor een verhoogde doorlaatbaarheid van de glomeruli voor eiwitten.

Opvallend hoog is vaak de activiteit van zure fosfatase in de cellen van endocriene klieren: schildklier, bijschildklier, β-cellen van de eilandjes van Langerhans (afb. 39), bijnierschors en bijniermerg. Bovendien is de activiteit van zure fosfatase hoog in vele secernerende cellen: slijmklieren van de trachea, Brunnerse klieren, endometrium in secretiefase, apicaal in exocriene cellen van het pancreas (afb. 39), hoofd- en dekcellen van het maagslijmvlies en apocrien veranderde epitheelcellen van de mammaklierbuizen bij mastopathie.

Op grond van deze waarnemingen vragen wij ons af of deze hoge activiteit van zure fosfatase een weerspiegeling is van de hoge secretoire activiteit van deze cellen. De hoge activiteit in de epitheelcellen van de endometriumbuisjes speciaal in de secretiefase wijst hier wel sterk op.

In bijnieren van patiënten, die leden aan de ziekte van Cushing namen we waar, dat de cellen met lage en hoge activiteit van zure fosfatase niet regelmatig in zônes verdeeld liggen. Mogelijk is dit beeld te verklaren door de disregulatie van dit orgaan, waarbij een normale regelmatige opschuiving van cellen uit de zona glomerulosa naar de zona reticularis niet meer plaatsvind.

Zure fosfatase als identificatiekenmerk

Bij verscheidene pathologische processen kan de morfologie van bepaalde cellen zodanig veranderen, dat het moeilijk kan zijn om deze cellen van andere cellen met ongeveer gelijk morfologisch aspect te onderscheiden. Bovendien kan het moeilijk zijn bepaalde cellen in een weefselcoupe op te sporen, indien in een groot gebied slechts enkele van deze cellen aanwezig zijn. Het is daartoe gemakkelijk indien bepaalde cellen gekenmerkt worden door hun gehalte aan bepaalde histochemisch aan te tonen bestanddelen. Macrofagen en andere cellen, die stapelen bevatten veel zure fosfatase en zijn daardoor gemakkelijk te onderscheiden van andere cellen.

Zo kan men met behulp van de methode voor zure fosfatase de macrofagen in tumoren(afb. 26, 30, 36, 37), in ontstekingsinfiltraten en rond corpora aliena snel opsporen. Maar men kan met behulp van deze methode eveneens gemakkelijk de reuzencellen in verschillende pathologische processen snel localiseren, bijvoorbeeld Aschoff-granulomen in het endocard (afb. 48) herkent men reeds met zwakke vergroting door hun hoge gehalte aan zure fosfatase.

Het gebruik van de histochemische methode voor zure fosfatase als celkenmerk kan van practisch belang zijn voor het stellen van de diagnose: ziekte van Hirschsprung, op proefexicisies genomen met de rectoscoop. In deze proefexcisies is meestal geen spierweefsel aanwezig, men zoekt dan naar de plexus van Meissner. Met behulp van de zure fosfatasereactie kan dit aanzienlijk gemakkelijker zijn. Men herkent de ganglioncellen reeds met een zwakke vergroting aan hun zure fosfatase activiteit (afb. 12a, 12b). Daar de incubatietijden voor ganglioncellen met de methode volgens Gomori tenminste een half uur bedraagt, is deze methode niet goed te gebruiken gedurende een operatie. Voor dit doel is de methode voor esterase (Pearse 1960) beter geschikt.

HOOFDSTUK IVb

SYSTEMATISCHE BESCHRIJVING VAN DE ACTIVITEIT VAN ZURE FOSFATASE IN NORMALE OMSTANDIGHEDEN

De organen en weefsels worden besproken in de volgorde van de coderingslijst van het Pathologisch Laboratorium. Deze lijst is te vinden aan het einde van de illustraties.

Tractus circulatorius

11 *Hart*

12 *Arteriën*

13 *Venen en capillairen*

De hartspiervezels bevatten nauwelijks zure fosfatase (afb. 48), slechts in cellen die lipofuscine bevatten is, op de plaats waar zich dit pigment bevindt, vaak zure fosfatase activiteit waar te nemen.

In de intima van arteriën en arteriolae is steeds vrij veel zure fosfatase aanwezig. In de kleinere arterietakjes is deze activiteit te zien door de gehele breedte van de intima, in grotere arteriën is de activiteit van zure fosfatase beperkt tot het vlak onder het endotheel gelegen deel van de intima. Het is niet goed na te gaan of de zure fosfatase alleen in de cellen of ook tussen de cellen aanwezig is. De activiteit van zure fosfatase in de endotheelcellen is gering.

17 *Lymfeklieren* (afb. 45)

In lymfatisch weefsel in lymfeklieren, maar ook elders, bijvoorbeeld in de wand van de appendix en de darm, is er sterke activiteit van zure fosfatase in de reticulumcellen. Deze reticulumcellen liggen regelmatig verspreid in de pulpa van de lymfeklieren en vaak wat dichter opeen rond reactiecentra. Ook in de reactiecentra liggen steeds enkele reticulumcellen, waarin sterke activiteit van zure fosfatase is waar te nemen. Tevens is er soms impregnatie van reticulumvezels te zien, die gezien het onderzoek van Wolf c.s. (1943), berust op een loodimpregnatie van deze vezels. In de arteriën is activiteit van zure fosfatase in de intima te zien.

18 *Milt*

Evenals in de lymfeklieren is activiteit van zure fosfatase zichtbaar te maken in de reticulumcellen van de milt. De reticulumcellen liggen rond de follikels. In de reactiecentra in de follikels liggen de reticulumcellen verder uit ekaar. Ook in de milt is soms loodimpregnatie van reticulumvezels te zien.

Tractus respiratorius

22 *Trachea*

23 *Bronchi*

In de epitheelcellen van de trachea, de bronchi en de bronchioli is in het gehele protoplasma activiteit van zure fosfatase aan te tonen. Deze activiteit is het sterkste in het naar het lumen gekeerde deel van het protoplasma. Opvallend is de zeer sterke activiteit van zure fosfatase in de cellen van de slijmkliertjes, in de wand van de trachea en de grotere bronchi.

24 *Long*

In de long is de activiteit van zure fosfatase in de alveolaire epitheelcellen gering. In het epitheel van de bronchioli is de activiteit van zure fosfatase voornamelijk apicaal in de cel zichtbaar te maken. In de arteriën is activiteit van zure fosfatase te zien in de intima.

Tractus digestivus

33 *Speekselklieren*

In de afvoergangen van de speekselklieren is de activiteit van zure fosfatase het sterkst in het apicale deel van de epitheelcellen. In de sereuze acini is er een matig sterke, door het gehele protoplasma verdeelde, activiteit. In de mucineuze acini, waarin met de perjoodzuur-Schiff-reactie veel slijm is aan te tonen, is de activiteit veel sterker. De activiteit van zure fosfatase is hier even sterk als in mucineuze klieren in de wand van trachea en bronchi van de long en in de acini van de klieren van Brunner in het duodenum.

36 *Oesophagus*

Er is geringe activiteit van zure fosfatase in de basaal gelegen epitheelcellen van de oesophagus. In de meer naar het lumen gelegen cellagen is de activiteit minimaal. In de cellen van de mucineuze kliertjes in de wand is sterke activiteit van zure fosfatase waar te nemen.

37 *Maag*

Alle epitheelcellen van het maagslijmvlies bevatten zure fosfatase. De activiteit is in de oppervlakkig gelegen slijmvormende cellen zeer gering. In het middelste derde deel van de crypten bevatten alle cellen zure fosfatase. In dit deel van de crypten liggen de meeste eosinofiele cellen, de dekcellen waarvan verondersteld wordt, dat ze het zoutzuur produceren. De sterkste activiteit van zure fosfatase is waar te nemen in de hoofdcellen: in het onderste deel van de crypten die geheel bekleed zijn met hoofdcellen en waar slechts enkele dekcellen te zien zijn, is de activiteit het sterkste. In de maag, evenals in de darm, zijn de ganglioncellen van

de plexus van Auerbach duidelijk zichtbaar doordat ze veel zure fosfatase bevatten (afb. 12).

38 *Duodenum*

39 *Dunne darm*

De activiteit van zure fosfatase in de epitheelcellen van de dunne darm is het sterkst in het gebied apicaal van de kern.

In het duodenum is een opvallend sterke activiteit van zure fosfatase waar te nemen in de cellen van de klieren van Brunner.

41 *Colon*

42 *Appendix*

43 *Rectum*

In het slijmvormend epitheel van de dikke darm en van de appendix is activiteit van zure fosfatase. De activiteit in deze cellen is echter geringer dan in de epitheelcellen van de dunne darm. In het epitheel van de dikke darm is de activiteit door de gehele cel ongeveer even sterk, in het apicale deel is vaak wat sterkere activiteit zichtbaar. Ook het epitheel van de appendix heeft deze verdeling van de activiteit van zure fosfatase.

Een typisch aspect bieden de autonome ganglioncellen in de plexus van Auerbach. Evenals in de maag, het duodenum en de dunne darm, vallen ook in de appendix, het colon en het rectum reeds met geringe vergroting de ganglioncelgroepen tussen de binnenste en de buitenste muscularis op. Bij sterker vergroten blijkt in het cytoplasma van de ganglioncellen, maar ook in de uitlopers van deze zenuwcellen, veel activiteit van zure fosfatase aanwezig te zijn.

44 *Lever* (afb. 11)

In de cellen van Kupffer, die deel uitmaken van het reticulo-endotheliale systeem, is sterke activiteit van zure fosfatase te zien. In de leverparenchymcellen is zure fosfatase aan te tonen centraal in de levercelbalkjes. Bij optimale fixatie zijn de korrelige neerslagen van loodsulfide, die de activiteit van de zure fosfatase aangeven, rond de galcapillairen gelegen.

45 *Galblaas*

46 *Galwegen*

In de epitheelcellen van de galafvoerwegen en de galblaas is activiteit van zure fosfatase zichtbaar te maken. Deze is apicaal in de cel enigszins sterker dan in het overige deel van het cytoplasma.

47 *Pancreas*

In de epitheelcellen van de acini, in het exocriene deel, maar ook in de cellen van de eilandjes van Langerhans, komt tamelijk sterke activiteit van zure fosfatase voor. Bij de mens is soms de activiteit van het enzym in de eilandjes iets sterker dan in de exocriene acini. Bij de muis en de rat is dit verschil veel duidelijker, daar de epitheelcellen van de acini

slechts zeer weinig zure fosfatase bevatten. Zowel bij de mens, als bij de muis en de rat, is de activiteit van de zure fosfatase hoog in de β cellen en laag in de α cellen. In de epitheelcellen van de afvoergangen is geringe activiteit van zure fosfatase, vooral apicaal van de kern, waar te nemen.

Tractus urogenitalis ♂

50 *Testis*

In de zaadbuisjes bestaat een vrij sterke activiteit van zure fosfatase in alle cellen, zowel in de cellen van de verschillende stadia van de spermatogenese, als in de cellen van Sertoli. In de interstitiële cellen van Leydig, is deze activiteit nog sterker dan in de cellen van de zaadbuisjes.

51 *Epididymis, ductus deferens* (afb. 6)

In het epitheel van de buisjes in de epididymis en in het epitheel van de ductus deferens is sterke activiteit van zure fosfatase aanwezig in het protoplasma van de epitheelcellen. Het sterkste is de activiteit in het apicaal van de kern gelegen protoplasma. Ook in het secreet in de buisjes is vrij sterke zure fosfatase activiteit te zien.

53 *Prostaat*

In geen enkele cel van enig ander orgaan komt zo sterke activiteit van zure fosfatase voor als in de epitheelcellen van de prostaat. Daarom moet prostaatweefsel slechts zeer kort in de incubatievloeistof worden geplaatst. Reeds 5 à 15 minuten is voldoende om zeer dichte, zwartbruine neerslagen te doen ontstaan.

56 *Urethra*

57 *Blaas*

58 *Pyelum, ureter*

In de cellen van het overgangsepitheel van pyelum, ureter en blaas is slechts een matig sterke, door het gehele celprotoplasma verdeelde, activiteit van zure fosfatase aan te tonen.

59 *Nier*

Het meest opvallend is de activiteit van zure fosfatase in de glomeruli. Het is niet goed mogelijk om met zekerheid uit te maken waar deze activiteit aan gebonden is. Het lijkt alsof, zowel de basale membranen, als de endotheelcellen zure fosfatase bevatten. Het buitenblad van de kapsel van Bowman bevat dit enzym nauwelijks. In de epitheelcellen van de tubuli contorti, de lis van Henle en de afvoerbuisjes is de activiteit van zure fosfatase waar te nemen als een diffuus fijnkorrelig neerslag, dat diffuus verdeeld in het protoplasma ligt. De tubuli contorti van de tweede orde vallen soms op door sterke zure fosfatase reactie. Wellicht wijst dit op een te sterke eiwitresorptie (zie hoofdstuk IVa).

Tractus genitalis ♀

60 *Ovarium*

De activiteit van zure fosfatase in de cellen van het ovariumstroma is gering. Sterke enzymactiviteit bestaat echter in de corpora lutea. Er is geen duidelijk verband met de ouderdom van het corpus luteum, zoals dit met de alkalische fosfatase wel het geval is. In de granulosa- en thecacellen is de enzymactiviteit hoger dan in het omgevend stroma.

61 *Tuba*

In het epitheel van de tuba is de activiteit van zure fosfatase het sterkst in het apicale deel van de cellen.

62 *Uterus, myometrium*

In de gladde spiercellen van het myometrium is slechts zeer weinig activiteit van zure fosfatase aan te tonen. Alleen in de intima van de vaten is meer activiteit van zure fosfatase waar te nemen.

63 *Endometrium*

Evenals de activiteit van alkalische fosfatase, ondergaat de activiteit van zure fosfatase in de epitheelcellen van het endometrium veranderingen die verband houden met de menstruele cyclus (Willighagen 1956). In het begin van de proliferatiefase is de zure fosfatase activiteit apicaal in de cellen van de klierbuisjes aanwezig. Gedurende de proliferatiefase en de secretiefase wordt de activiteit van zure fosfatase sterker en breidt zich uit naar het basale deel van de cellen. Aan het eind van de secretiefase is de activiteit zeer sterk, in het gehele cellichaam liggen zwarte korrelige loodsulfideneerslagen, slechts de kernen blijven uitgespaard. In de menstruele fase, na de dissociatie van het endometrium, verdwijnt de zure fosfatase activiteit bijna geheel. Slechts diffuus verspreid in het protoplasma van de epitheelcellen liggen nu fijnkorrelige loodsulfideneerslagen.

In het stroma van het endometrium is ook activiteit van zure fosfatase te zien. Deze enzymactiviteit is niet sterk, neemt echter toe in de secretiefase. Als de stromacellen in het praemenstruele deel van de cyclus zwellen, wordt de activiteit sterker. Vooral als de stromacellen pseudodeciduaal gezwollen zijn, evenals in de tot decidua geworden stromacellen, is de activiteit van zure fosfatase hoog.

64 *Collum uteri, portio*

In het cylindrisch epitheel van de cervix is de activiteit van zure fosfatase het sterkst in het apicale deel van de epitheelcellen. In het plaveiselepitheel van de portio is geringe enzymactiviteit in de basaal gelegen cellen waar te nemen. In de meer oppervlakkig gelegen cellagen is de activiteit zeer gering.

66 *Jonge vrucht*

67 *Foetus*

Van beide onderzochte embryonen, resp. met een kop-hiellengte van 9 cm en 6 mm, kon

slechts een deel van de organen onderzocht worden, omdat het niet mogelijk was beide embryonen geheel op serie te snijden. De activiteit van zure fosfatase in de onderzochte organen verschilde niet merkbaar van die in volwassen organen. Zo is in de lever reeds sterke activiteit waar te nemen in de cellen van Kupffer en in de leverparenchymcellen.

68 *Placenta*

De cellen van de syncytio- en de cytotrofoblast in de placenta bevatten door het gehele protoplasma sterke activiteit van zure fosfatase. Ook in de cellen van Hofbauer valt deze waar te nemen. Overeenkomstige localisaties van zure fosfatase in de menselijke placenta werden beschreven door Thomsen c.s. (1955).

69 *Mamma*

In het epitheel van de acini en van de afvoerwegen van de mamma is de activiteit van zure fosfatase zichtbaar te maken. Deze is echter niet zeer sterk. In het epitheel van de afvoergangen is de activiteit vooral apicaal in de cellen gelocaliseerd. In de acini van functionerend mammaklierweefsel van een vrouw, die na een tangverlossing aan sepsis overleed, werd een hoge activiteit van zure fosfatase gevonden.

70 t/m 79 *Zenuwstelsel*

In de ganglioncellen is veel zure fosfatase aanwezig (afb. 12). De activiteit is echter niet in alle ganglioncellen even sterk.

Zeer sterk is de enzymactiviteit in de ganglioncellen van de motorische schors, de motorische voorhoorncellen, de cellen van Purkinje en de ganglioncellen in de autonome ganglia (Cammermeyer 1949). Op de activiteit in de plexus van Auerbach werd bij de beschrijving van de activiteit van zure fosfatase in de maag en in de darm reeds opmerkzaam gemaakt. Ook in de uitlopers van de ganglioncellen is zure fosfatase activiteit waar te nemen; Wolf c.s. (1943) veronderstelde, dat dit een kunstproduct is, door loodimpregnatie van zenuwuitlopers. In contrôlecoupes die wij zonder substraat hadden geïncubeerd, zagen we deze loodimpregnatie echter niet, zodat men, ons insziens, niet behoeft te twijfelen aan de enzymactiviteit in deze zenuwuitlopers. Ook gliacellen bevatten zure fosfatase.

In het epitheel van de plexus choroideus is apicaal van de kern vrij sterke activiteit van zure fosfatase waar te nemen.

80 *Huid*

81 *Subcutis*

82 *Diep bindweefsel*

Geringe activiteit van zure fosfatase is aanwezig in de basale cellen van de epidermis. In de cellen van de holocriene talgkliercellen bestaat vrij sterke, apicaal gelocaliseerde, activiteit van zure fosfatase. De acini van de zweetklieren laten een matig sterke activiteit zien. In de subcutis en het diepere bindweefsel liggen verspreid enkele cellen met een sterke activiteit van zure fosfatase. Deze cellen behoren waarschijnlijk tot de klasse der histiocyten.

83 *Spieren*

In normaal spierweefsel is de activiteit van zure fosfatase zeer gering. Slechts in het interstitium liggen enkele cellen die zure fosfatase bevatten. Ook deze cellen behoren waarschijnlijk tot de klasse der histiocyten.

89 *Beenderstelsel*

Het is niet goed mogelijk om in bot, dat ontkalkt is, volgens de methode van Lorch (1946, 1947), Greep (1947) of Freiman (1953) zure fosfatase aan te tonen. Wel is dit mogelijk in coupes van pijpbeenderen van jonge muizen, daar deze zonder ontkalking kunnen worden gesneden.

Met de methode van Gomori wordt hierbij op de plaats waar beenzouten liggen, lood gebonden. Na behandeling met ammoniumsulfide ontstaan hier dikke loodsulfideneerslagen, waardoor de coupes moeilijk te beoordelen zijn. Wij konden dit vermijden door de coupes van onontkalkt weefsel voor incubatie te ontkalken in 5% EDTA-oplossing, zoals die gebruikt wordt voor de ontkalking van botstukjes (zie hoofdstuk VI). De enzymactiviteit blijft hierna geheel behouden. Op deze wijze nemen we waar, dat de osteocyten en de cellen van de haematopoëse weinig zure fosfatase bevatten. Opvallend sterk is de zure fosfatase activiteit in osteoclasten. Op deze waarneming wezen we reeds in onze beschouwing in hoofdstuk IVa.

Klieren met interne secretie

90 *Schildklier*

In de epitheelcellen van de follikels van de schildklier is sterke activiteit van zure fosfatase waar te nemen in dat deel van het protoplasma dat naar het lumen van de follikels gericht is. Maar ook basaal van de kernen is enige activiteit te zien.

91 *Bijschildklier*

In de cellen van de bijschildklier is de activiteit van zure fosfatase hoog. Er is geen waarneembaar verschil in de intensiteit van de enzymactiviteit in de verschillende celtypen.

92 *Thymus*

Diffuus is in alle cellen van de thymus een geringe activiteit van zure fosfatase aanwezig. Verspreid in het parenchym van de thymus liggen cellen met sterke activiteit, dit zijn de reticulumcellen.

93 *Bijnier*

In de bijnierschors is de activiteit van zure fosfatase sterk. De enzymactiviteit is in de cellen van de zona glomerulosa het minst sterk. In de zona fasciculata is de zure fosfatase activiteit hoger, in de zona reticularis is zij het hoogst.

In de cellen van het bijniermerg is een matig sterke activiteit van zure fosfatase aanwezig. Het is niet goed mogelijk om de ganglioncellen in dit merg op grond van hun zure fosfatase te onderscheiden. Opvallend hoog is de activiteit van zure fosfatase in het bijniermerg van de rat.

94 *Hypofyse*

De activiteit van zure fosfatase in de hypofyse is matig sterk. De verschillende celtypen zijn niet te onderscheiden op grond van deze activiteit.

HOOFDSTUK IVc

SYSTEMATISCHE BESCHRIJVING VAN DE ACTIVITEIT VAN ZURE FOSFATASE IN PATHOLOGISCHE OMSTANDIGHEDEN

De organen en weefsels worden besproken in de volgorde van de coderingslijst van het Pathologisch Laboratorium. Deze lijst is te vinden aan het einde van de illustraties.

De activiteit van zure fosfatase in gezwellen is tezamen met die van alkalische fosfatase beschreven in hoofdstuk Vb.

Tractus circulatorius

11 *Hart*

In een aantal hartoren, afkomstig van patiënten die geopereerd werden voor afwijkingen aan de mitraliskleppen, werden *Aschoff granulomen* in verschillende stadia onderzocht. Reeds bij zwakke vergroting zijn de „actieve" granulomen in de zure fosfatase preparaten te onderkennen (afb. 48). Met sterke vergroting zien wij, dat histiocyten, gezwollen mesenchymale cellen en reuzencellen een zeer sterke activiteit van zure fosfatase laten zien. Reeds in jonge granulomen met slechts enkele histiocyten is deze activiteit van zure fosfatase aanwezig. Als deze cellen verdwijnen en er slechts een litteken is overgebleven, is er geen zure fosfatase activiteit meer waar te nemen.

In de spiercellen van harten van oudere mensen worden vaak apicaal van de kernen ophopingen gezien van de *lipofuscine*. In een klein deel van onze preparaten van het myocard van de mens, namen wij bij deze ophopingen van lipofuscine activiteit van zure fosfatase waar. De enzymactiviteit in de Aschoff granulomen en in de hartspiercellen bespraken wij reeds in hoofdstuk IVa.

17 *Lymfeklieren*

In normaal lymfklierweefsel liggen reticulumcellen met sterke activiteit van zure fosfatase regelmatig verspreid, vooral in de pulpa. Rond de follikels liggen de reticulumcellen met activiteit van zure fosfatase dicht opeen, in de follikels zijn slechts enkele cellen positief. In

geprikkelde lymfeklieren, als de reticulumcellen prolifereren en zwellen, lijkt het, alsof er meer reticulumcellen met zure fosfatase activiteit aanwezig zijn, dan in normale lymfeklieren. Een nog duidelijker toename van het aantal cellen met zure fosfatase activiteit zien wij bij *specifieke processen*. In lymfeklieren met tuberkels en tuberculeuze verkazing, zijn alle epitheloide cellen en alle reuzencellen van Langhans sterk positief (zie ook 24 Longen). In een lymfeklier bij een geval van *kattekrabziekte*, vonden wij eveneens een sterke toename van reticulumcellen met hoge activiteit van zure fosfatase. Vooral de cellen in de granulomen en de gezwollen cellen rond necrosehaardjes bevatten zeer veel zure fosfatase.

Tractus respiratorius

24 *Longen*

Diverse stadia van *tuberculeus granulatieweefsel* konden wij onderzoeken in longweefsel. De activiteit van zure fosfatase hierbij is als volgt:

In tuberkels bevatten de geactiveerde bindweefselcellen zoals histiocyten, epitheloide cellen en de reuzencellen van Langhans veel zure fosfatase (afb. 46, 47). In necrose haarden was soms centraal in celvrije gebieden een geringe diffuse bruinkleuring te zien. Dit geringe neerslag van loodsulfide is zeker niet steeds het gevolg van enzymactiviteit, daar in contrôlecoupes soms deze zelfde bruine tint is waar te nemen.

In de buitenste lagen van de necrose, vindt men soms nog celresten waarin activiteit van zure fosfatase aanwezig is. In oudere laesies zijn deze cellen in het necrosegebied niet meer te vinden. In de wand van fibreus afgekapselde kaashaarden liggen nog maar enkele cellen met hoge activiteit van zure fosfatase. Als een kaashaard omgeven is door bindweefsel, verdwijnen de epitheloide cellen en de reuzencellen waarin de zure fosfatase gelocaliseerd is.

Bij andere *ontstekingsprocessen* in de longen zien wij in de alveoli vaak vrijliggende gezwollen macrofagen, de alveolaire fagocyten (afb. 43). Tevens ziet men bij gevallen van mitralisstenose in de alveoli van de longen deze cellen, die dan veel *haemosiderine* bevatten. In deze alveolaire macrofagen bestaat een opvallend sterke activiteit van zure fosfatase.

Tractus digestivus

41 *Colon*

43 *Rectum*

Het was mogelijk enkele operatiepreparaten te bewerken van patiënten met de *ziekte van Hirschprung*. In het proximale deel van deze resectiepreparaten, het gedilateerde deel, is de activiteit van zure fosfatase in de plexus van Auerbach en Meissner normaal. Alle ganglioncellen zijn microscopisch met kleine vergrotingen reeds als donkerzwartbruine celgroepjes tussen de spierlagen te onderscheiden (afb. 12a).

In het trechtervormige overgangsstuk tussen het nauwe distale rectum en het gedilateerde deel zijn de ganglia van de plexus van Auerbach en de plexus van Meissner kleiner en zij bevatten veel minder ganglioncellen. De ganglioncellen, die er zijn, laten echter een normale activiteit van zure fosfatase zien. In het meest distale, nauwe deel, dat aganglionair is, is slechts in de hyperplastische zenuwbundels een geringe activiteit van zure fosfatase aanwezig (afb. 12b).

44 *Lever*

De verdeling van zure fosfatase activiteit in de lever is beschreven in hoofdstuk IVb. Er is sterke activiteit in de cellen van K u p f f e r (afb. 11). In de parenchymcellen van de lever is vaak waar te nemen, dat de sterkste activiteit van zure fosfatase gelocaliseerd is rond de galcapillairen. Deze zure fosfatase activiteit in de levercellen is op dezelfde plaats gelocaliseerd, waar vaak lipofuscine kan worden aangetoond.

Bij *haemosiderosis* vindt men fijnkorrelige haemosiderine afzettingen in de levercellen, in dezelfde localisatie als de activiteit van zure fosfatase, namelijk rond de galcapillairen. Bij haemosiderosis zijn er bovendien in de K u p f f e r cellen en in de macrofagen, die men vindt in het stroma van de driehoekjes van K i e r n a n, grovere haemosiderine afzettingen. In deze cellen is eveneens een hoge activiteit van zure fosfatase zichtbaar te maken. We zien dus in gevallen van haemosiderosis een merkwaardige gelijkvormigheid van het patroon van de haemosiderine afzetting en dat van de activiteit van zure fosfatase.

Hoewel bij *levercirrhosen* de opbouw van de lever sterk veranderd is, is de verdeling van de activiteit van zure fosfatase in de levercellen gelijk aan die in de cellen van normale levers. Het lijkt eveneens alsof de enzymactiviteit het sterkst is rond de galcapillairen. Tussen de levercellen liggen evenals in normaal leverweefsel talrijke K u p f f e r cellen met sterke activiteit van zure fosfatase. Men vindt echter wel in het nieuw gevormde bindweefsel, afhankelijk van de activiteit van het proces, veel of soms zeer veel histocytaire cellen met een sterke activiteit van zure fosfatase. In een geval van *chronische hepatitis,* dat wij onderzochten, waarbij in het leverweefsel veel necrose te zien was, kregen wij de indruk alsof er in necrobiotische cellen een sterkere activiteit van zure fosfatase te zien was dan in de nog normale levercellen. Wij zagen in deze cellen een diffuse enzymactiviteit door het gehele cytoplasma heen. Tussen de necrotische celmassa's, die vaak slechts bestaan uit celdébris, liggen talrijke macrofagen met een sterke activiteit van zure fosfatase. Het is hierdoor in deze preparaten vaak moeilijk de weefselmacrofagen en de necrobiotische levercellen van elkaar te onderscheiden.

Tractus urogenitalis

59 *Nier*

De activiteit van zure fosfatase in het nierparenchym heeft een typisch aspect (hoofdstuk IVa). Terwijl de activiteit van zure fosfatase in de nier onder diverse pathologische omstandigheden daalt of plaatselijk geheel verdwijnt, is dat met de zure fosfatase zelden het geval. Ook in gedeeltelijk *sclerotische glomeruli* is de activiteit van zure fosfatase in de resten van de glomerulushssen nog sterk. Slechts als de glomeruli volkomen gehyaliniseerd zijn en sterk geschrompeld, is het enzym niet meer aan te tonen.

Terwijl in de normale tubuli contorti de activiteit van zure fosfatase overal ongeveer even sterk is, is deze in pathologische veranderde nieren in bepaalde groepen tubuli duidelijk verhoogd (afb. 54). De epitheelcellen van deze tubuli zijn gezwollen, het protoplasma is korrelig en eosinofiel.

Wij menen, dat deze beelden ontstaan, doordat in deze tubuli terugresorptie plaats vindt van eiwitten.

Bij gevallen van *chronische glomerulonefritis, chronische pyelonefritis* en de *ziekte van Kahler,* zagen wij dit beeld regelmatig. Zoals in hoofdstuk IVa wordt besproken vormen deze

waarnemingen één geheel met andere waarnemingen, die ons tot de opvatting leidden, dat er een verband bestaat tussen de activiteit van zure fosfatase en opneming en stapeling van verschillende substanties. De activiteit van zure fosfatase in tubuli waaronder experimentele omstandigheden eiwit wordt geresorbeerd past eveneens goed in dit schema. Oliver (1954) heeft de terugresorptie van eiwitten in de tubuli contorti bij ratten bestudeerd. Hij komt met histochemische en immunochemische methoden tot de conclusie, dat bij de terugresorptie van eiwit in de cellen van de tubuli contorti korrels gevormd worden, die bestaan uit het teruggeresorbeerde eiwit, waaraan mitochondriën of mitochondriën bestanddelen zijn gebonden. Straus (1954) vond in deze korrels, die hij met gefractioneerde centrifugatie isoleerde, hoge activiteit van zure fosfatase. Onze waarnemingen zijn dus in overeenstemming met dit onderzoek. Hierop wezen wij in hoofdstuk IVa.

Indien tubuli en glomeruli necrotisch worden, zoals bij gevallen van *locale ischaemische necrose* van de nier, is er geen activiteit van zure fosfatase meer aan te tonen. In atrofische tubuli contorti is de zure fosfatase activiteit laag. In hoofdstuk IIIa vermeldden wij een geval van *symmetrische schorsnecrose*. In het necrotische deel van de schors was geen zure fosfatase aan te tonen. De juxta medullaire glomeruli bevatten ongeveer evenveel zure fosfatase als normale glomeruli. De resterende tubuli contorti waren deels atrofisch, deels hypertrofisch. De activiteit van zure fosfatase is in de atrofische tubuli laag. De cellen van de hypertrofische tubuli waren gezwollen en hadden een sterk gekorreld eosinofiel protoplasma. De activiteit van zure fosfatase in deze cellen is hoog. Wij veronderstellen, dat in deze tubuli eveneens resorptie van eiwit heeft plaats gevonden.

Enkele tuberculeuze haarden van de nier konden worden onderzocht. De activiteit van zure fosfatase in *tuberculeus granulatieweefsel* werd reeds beschreven voor de long (24). In de tuberculeuze veranderingen van de nier is de localisatie van de activiteit van zure fosfatase dezelfde.

In ontstekingsinfiltraten in de nier, vooral bij *interstitiële nefritis,* vindt men verspreid in het weefsel veel macrofagen met een sterke activiteit van zure fosfatase.

60 *Ovarium*

In ovaria liggen, vaak rond resten van corpora lutea, cellen die een pigment bevatten, dat eigenschappen heeft van *lipofuscine* en *ceroid*. In deze cellen is een zeer sterke activiteit van zure fosfatase aanwezig (afb. 44). Rond *endometriose* haarden vindt men schuimcellen, die lipiden en haemosiderine bevatten. Ook in deze cellen is de activiteit van zure fosfatase zeer hoog.

69 *Mamma*

Evenals in het epitheel van de normale mamma is in het geprolifereerde epitheel van acini en melkgangen in gevallen van *mastopathie* de activiteit van zure fosfatase gering. Slechts indien de epitheelcellen van de acini en afvoergangen, apocrien veranderd zijn, is de activiteit van zure fosfatase opvallend sterk. De zure fosfatase is gelocaliseerd in het apicale deel van de cellen, zoals eveneens in apocriene kliercellen van talgklieren is te zien.

Zenuwstelsel

74 *Hersenvliezen*

In het ontstekingsinfiltraat bij *acute meningitis,* zagen wij verspreid tussen de polynucleaire

leucocyten, die weinig zure fosfatase bevatten, talrijke grote cellen van het macrofaagtype met hoge activiteit van zure fosfatase, zoals steeds in macrofagen kan worden waargenomen.

Huid, bindweefsel

81 *Subcutis*

82 *Diep bindweefsel*

In ontstekingsinfiltraten in bindweefsel zijn histiocyten aanwezig, die veel zure fosfatase bevatten. In dichte leucocytaire infiltraten bij acute ontstekingen is het aantal van deze cellen gering, maar in chronische „rondcellige" ontstekingsinfiltraten is het aantal vaak zeer groot. Ook in het stroma van gezwellen liggen veelal talrijke, zeer veel zure fosfatase bevattende, histiocyten. In *vreemdlichaam granulomen* bevatten alle, tot histiocyten geactiveerde bindweefselcellen en vreemdlichaam reuzencellen veel zure fosfatase. Een voorbeeld hiervan was de sterke activiteit van zure fosfatase in de grotere en kleinere reuzencellen rond afzettingen van uraten in een *jichtknobbel,* die wij onderzochten (afb. 50, 51).

Klieren met interne secretie

90 *Schildklier*

In drie gevallen van *chronische thyreoiditis (type Quervain)* zagen wij in de cellen waaruit de granulomen zijn opgebouwd, alsmede in de reuzencellen, die hierbij worden aangetroffen een sterke zure fosfatase activiteit (afb. 46). In het epitheel van *dysplastisch schildklierweefsel* is de activiteit van zure fosfatase, evenals in normaal schildklierweefsel voornamelijk apicaal in de cellen gelocaliseerd. De activiteit van zure fosfatase is ongeveer even sterk als in normaal schildklierweefsel.

93 *Bijnieren*

In coupes van de bijnieren van patiënten, die lijdende waren aan de *ziekte van Cushing,* werd behalve de activiteit van alkalische fosfatase ook die van zure fosfatase onderzocht. In normale bijnieren is er in de schors een geleidelijke toename van activiteit van zure fosfatase van de zona glomerulosa, naar de zona reticularis. In de cellen van de zona glomerulosa is reeds een sterke enzymactiviteit te zien, die in de cellen van de zona fasciculata sterker is en in de cellen van de zona reticularis de hoogste graad bereikt. In de schors van de bijnieren afkomstig van patiënten met de *ziekte van Cushing* is deze toename in de dieper gelegen cellagen eveneens te zien. Deze toename is vaak echter minder geleidelijk, er liggen dan celnesten met duidelijk hogere enzymactiviteit tussen cellen met lagere enzymactiviteit. Dit is vooral goed te zien in bijnieren met nodeuze hyperplastische velden.

In bijnieren van patiënten met de *ziekte van Cushing,* die ogenschijnlijk een normaal gelaagde bouw bezitten valt soms op, dat de toeneming van activiteit van zure fosfatase in de dieper gelegen celgroepen niet geleidelijk is, maar dat in de zona fasciculata onregelmatig verspreid groepen cellen aanwezig zijn met hogere activiteit van zure fosfatase, dan de omgevende cellen van deze zelfde schorslaag.

HOOFDSTUK Va

ALKALISCHE EN ZURE FOSFATASE IN GEZWELWEEFSEL

Zodra het mogelijk werd om histochemisch de activiteit van enzymen in weefselcoupes aan te tonen, hebben verscheidene onderzoekers zich afgevraagd of gezwelweefsels zich in dit opzicht zouden onderscheiden van de normale weefsels en of er verschillen zouden bestaan tussen de verschillende gezwelsoorten.

Zo vindt men reeds in de eerste artikelen van Gomori (1941) en Kabath en Furth (1941) over de activiteit van alkalische fosfatase, enkele tumoren van muis, kip en ook van de mens beschreven. Manheimer en Seligman (1948) beschrijven de activiteit van alkalische fosfatase in 95 menselijke tumoren, onderzocht met een methode waarbij zij α-naphtolfosfaat als substraat gebruikten. Zij wijzen vooral op sterke fosfatase activiteit in capillair endotheel in tumoren. Dit kunnen wij niet bevestigen. In tumoren, waarvan de tumorcellen geen alkalische fosfatase bevatten, steken de capillairen weliswaar soms sterk af, maar daarnaast zijn er ook tumoren, waarbij in het centrum van de tumor de activiteit van alkalische fosfatase in het vaatendotheel geheel ontbreekt.

Arnold en Oech (1950) beschrijven voor een dertigtal menselijke tumoren de localisatie van de activiteit van alkalische fosfatase. Deze beschrijving is bijna geheel in overeenstemming met de localisaties die wij vinden.

Landow (1942), d'Ancona (1954) en Friede (1956) beschrijven alkalische fosfatase activiteit in hersentumoren, o.a. meningiomen.

Gomori (1953) geeft in het kader van een symposion over gastroenterologie, een beschouwing over de histochemie van de maag en vermeldt ook de activiteit van alkalische en zure fosfatase in maagcarcinoom.

Het grootste materiaal over bottumoren beschrijven Schajowicz en Cabrini (1954). Mammagezwellen werden onderzocht door Glück (1952),

Drennan (1952), Nosalevic (1954) en Foraker (1956).

Alkalische fosfatase in tumoren van het corpus uteri wordt beschreven door Atkinson en Gusberg (1948) en Jones c.s. (1952), tumoren van de portio door Ayre (1951), Rev (1952).

Zure fosfatase activiteit in het endometrium in normale en pathologische omstandigheden is onderzocht door Goldberg en Jones (1956).

Foraker (1956) deed een uitgebreid histochemisch onderzoek van plaveiselcelcarcinomen en onderzocht o.a. ook de alkalische fosfatase activiteit.

Het prostaatcarcinoom is door vele auteurs onderzocht. De alkalische en de zure fosfatase activiteit beschrijft Geller (1954).

Pearson c.s. (1950) beschrijft de localisatie van de alkalische fosfatase activiteit tijdens de ontwikkeling van het botergeel-hepatoom van de rat.

Pearson en Richardson (1952) en Richardson en Pearson (1954) beschrijven deze activiteit bij de ontwikkeling van mammacarcinoom bij muizen.

Bovendien vindt men verspreidt in een aantal artikelen nog incidentele vermeldingen over de localisatie van alkalische en zure fosfatase in tumoren.

Uit deze mededelingen blijkt in ieder geval, dat er niet één vast patroon van enzymactiviteit in gezwelweefsel bestaat. En ook, dat er verschillen tussen gezwelweefsel en oorspronkelijk weefsel kunnen bestaan. Men kan echter uit deze literatuur geen inzicht verkrijgen, welke bijdrage histochemisch enzymonderzoek kan leveren bij de practische diagnostiek.

Bovendien kan men geen wetmatigheden vaststellen, alvorens men de enzymactiviteit in een grote hoeveelheid gezwellen heeft onderzocht. Wij waren in staat om in ± 700 gezwellen de activiteit van alkalische en zure fosfatase te onderzoeken. In hoofdstuk Vb worden onze waarnemingen uitvoerig beschreven.

Uit theoretisch standpunt beschouwd, zou men de kennis van de activiteiten van deze enzymen in gezwellen als volgt kunnen toepassen:

a. Het enzympatroon zou gebruikt kunnen worden bij de diagnostiek.

b. Verschillen in enzymactiviteit tussen tumoren van eenzelfde weefsel zouden een aanwijzing kunnen zijn omtrent de differentiatiegraad van de tumor. Zo lijkt het mogelijk, dat bij sommige gezwelsoorten het enzympatroon gecorreleerd is met de kwaadaardigheid, de stralengevoeligheid of de prognose van de tumor.

c. Histochemisch enzymonderzoek van tumoren zou gegevens kunnen leveren, die voor de biochemie van belang zijn. Door middel van biochemisch

onderzoek van een tumor bepaalt men immers de gemiddelde enzymactiviteit in een groot aantal cellen. Bij histochemisch onderzoek kan men vaak opvallende verschillen zien in de enzymactiviteit in de verschillende cellen, waaruit dit tumorweefsel is samengesteld.

Ad a. **Gebruik van het enzympatroon bij de diagnostiek**

Uiteraard zal men voor diagnostiek beter gebruik kunnen maken van het histochemisch enzympatroon indien dit enzympatroon in een bepaald gezwel steeds hetzelfde is. Wij waren in staat om van een 40-tal gezwellen, behalve de oorspronkelijke tumor eveneens een of meerdere metastasen te onderzoeken (tabel Va1). Bovendien onderzochten wij van enkele tumoren biopsiën, die

TABEL Va1

Overeenkomst van de activiteit van alkalische- en zure fosfatase in gezwellen, metastasen en recidieven van deze gezwellen.

Onderzochte metastasen	aantal gevallen
plaveiselcelcarcinoom van de long	9
adenocarcinoom van de long	1
maagcarcinoom	5
coloncarcinoom	4
mammacarcinoom	6
chorionepithelioom	1
prostaatcarcinoom	3
hypernefroom	1
adenocarcinoom van het ovarium	1

Onderzochte recidieven	aantal gevallen
plaveiselcelcarcinoom van de long	2
anaplastisch adenocarcinoom van de long	1
neuskeelfibroom	1
coloncarcinoom	1

gedaan werden met tussenpozen van enkele maanden. In geen enkel geval zagen wij verschillen in de activiteit van alkalische en zure fosfatase tussen de oorspronkelijke tumor en de metastase of de nieuwe biopsie [1]).

Meestal zal het histochemisch enzympatroon slechts een bevestiging van de

[1]) Bij het onderzoek naar de activiteit van aminopeptidase namen wij bij een geval van maagcarcinoom waar, dat in de oorspronkelijke tumor dit enzym wel, in een metastase in het ovarium dit enzym niet aan te tonen was.

door morfologisch onderzoek gestelde diagnose geven. Wij hebben echter de ervaring opgedaan, dat in sommige gevallen het histochemisch onderzoek van tumoren voor de differentiële diagnose van even groot belang kan zijn als het zuiver morfologisch onderzoek en in enkele gevallen was het enzympatroon zelfs doorslaggevend bij het stellen van de diagnose!

Welke is nu de betekenis van onze waarnemingen voor de morfologische diagnostiek?

Alkalische fosfatase

Het is ons mogelijk gebleken om de tumoren in groepen in te delen op grond van de activiteit van alkalische fosfatase in de tumorcellen. We kunnen tumoren zonder alkalische fosfatase in de tumorcellen onderscheiden van tumoren, die in de tumorcellen wel alkalische fosfatase bevatten.

Deze laatste groep is weer onder te verdelen. Er zijn tumoren, waarin de activiteit van alkalische fosfatase in alle tumorcellen hoog is, tumoren met lage activiteit van alkalische fosfatase in de cellen, en tumoren waarin slechts in een deel van de tumorcellen activiteit van alkalische fosfatase is waar te nemen. Een overzicht van de activiteit van alkalische fosfatase in de verschillende tumoren is te vinden in onderstaande tabel Va2.

In de meeste tumoren van de mens is met histochemische methoden, geen activiteit van alkalische fosfatase aan te tonen. Er is een kleine groep tumoren, waarvan een deel van de tumorcellen alkalische fosfatase bevat en een groep tumoren, waarbij in alle tumorcellen activiteit van alkalische fosfatase is waar te nemen.

Van verschillende tumorsoorten werd een zodanig aantal onderzocht, dat de gevonden beelden als representatief te beschouwen zijn. Van vele tumorsoorten zijn er slechts enkele exemplaren in het materiaal aanwezig, zodat wij wel een indruk hebben van de enzymactiviteit in deze tumorsoort, maar geen zekerheid over eventuele variaties van deze activiteit.

Zure fosfatase

Een scherpe indeling van de tumoren op grond van de activiteit van zure fosfatase in de tumorcellen is niet mogelijk. De zure fosfatase activiteit in een bepaalde tumorsoort laat meestal een zekere variatie zien. Wel zijn er tumoren, waarin de activiteit van zure fosfatase steeds laag is en andere tumoren, waarin deze activiteit steeds hoog is. Maar er zijn ook tumoren, waarin de activiteit van zure fosfatase kan variëren van + tot +++.

TABEL Va2

Alkalische fosfatase activiteit in gezwellen

positief hoog	*locaal positief*	*negatief*
fibroma giganto-cellulare	capillair haemangioom	haemangio-endothelioom
osteogeen sarcoom	menggezwellen van de parotis	haemangio-pericytoom
parossaal ossificerend fibrosarcoom	plaveiselcelcarcinoom van de oesophagus	maligne reticulumcelgroei
	(neuro) fibroom	(neuro) fibrosarcoom
spoelcelsarcoom		rondcelsarcoom
adenorcarcinoom van de long	cylindroom	plaveiselcelcarcinoom van de long
chorionepithelioom	mesothelioom	carcinoid adenoom van de long
seminoom	hypernefroom	Wilms' tumor van de nier
		maagcarcinoom
	adenomatoide tumor van de epididymis	galblaascarcinoom
hepatocellulair carcinoom		carcinoom van de afvoerende galwegen
laag		
mammacarcinoom (4)	mammacarcinoom (8)	mammacarcinoom (50)
adenocarcinoom van de uterus		anaplastisch corpuscarcinoom
anaplastisch portio-carcinoom		plaveiselcelcarcinoom van de portio
carcinoom van het ovarium		maligne carcinoid van de darm
		coloncarcinoom
	papillair schildkliercarcinoom	schildkliercarcinoom
		prostaatcarcinoom
		carcinoom van de afvoerende urinewegen
		basalioom, planocellulair huidcarcinoom
		phaeochromocytoom

TABEL Va3

Zure fosfatase activiteit in gezwellen

±	+	2+	3+	>3+
plaveiselcelcarcinoom (oesophagus, huid, portio, long)	adenocarcioom van de long	cylindroom		prostaatcarcinoom
	mesothelioom	menggezwel van de parotis		
scirrheus maagcarcinoom	anaplastisch maagcarcinoom	adenocarcioom van de maag		
. . . . . mammacarcinoom				
carcinoom van de afvoerende galwegen			phaeochromocytoom	
bindweefselgezwellen			carcinoid van de darm en de long	
	coloncarcinoom		chorionepithelioom	
	carcinomen van de afvoerende urinewegen			
	schildkliercarcinoom			
seminoom		adenomatoide tumor van de epididymis		
		hypernefroom	bijschildklieradenoom	
	Wilms' tumor		histiocytoom	
		ovariumcarcinoom	bijnierschorscarcinoom	
		adenocarcinoom van het endometrium		
		osteosarcoom		

In tabel Va3 wordt voor een aantal soorten tumoren, waarvan verscheidene exemplaren zijn onderzocht, de variatiebreedte van de activiteit van zure fosfatase aangegeven.

Men komt op deze wijze tot een groepering en men is in staat op grond van de activiteit van zure fosfatase tumoren van elkaar te onderscheiden.

In plaveiselcelcarcinomen en bindweefsel-tumoren is de activiteit van zure fosfatase steeds laag. In tumoren van het chromaffinesysteem, van de bijschildklieren en in het onderzochte histiocytoom is de activiteit van zure fosfatase hoog. In prostaatcarcinoom is deze zeer hoog.

De methoden voor alkalische en zure fosfatase kunnen afzonderlijk, maar ook tezamen worden gebruikt om in twijfelgevallen de diagnose te helpen stellen. Bij het stellen van de diagnose gaat men uit van het morfologisch beeld. In de pathologische laboratoria maakt men gebruik van een aantal bijzondere kleuringen, zoals bijvoorbeeld kleuringen voor collageen, reticuline, elastica, ijzer en calcium om tot een diagnose te komen. Het gebruik van de histochemische enzymreacties voor alkalische en zure fosfatase sluit hier direct bij aan.

De mogelijkheden van de practische toepassing van de methoden voor alkalische en zure fosfatase kunnen beter toegelicht worden aan de hand van enkele voorbeelden.

Indien men in een metastase van een adenocarcinoom de activiteit van alkalische en zure fosfatase onderzoekt, beperkt men het aantal mogelijkheden, waarmee de klinicus rekening moet houden, aanzienlijk (tabel Va4).

TABEL Va4

Adenocarcinomen	alkalische fosfatase	zure fosfatase
Adenocarcinoom van de long	2+	+
Adenocarcinoom van het corpus uteri	+	2+
Adenocarcinoom van de maag	—	+ tot 2+
Adenocarcinoom van de galblaas en de galwegen	—	± tot +
Adenocarcinoom van het pancreas	—	± tot +
Adenocarcinoom van de dikke en dunne darm	—	± tot 2+
Adenocarcinoom van de prostaat	—	> 3+
Tubulaire delen van het hypernephroom	+	+

Door mede gebruik te maken van andere gegevens, zoals klinische waarnemingen, kan men dan vaak met zekerheid de oorsprong van de tumor aanwijzen.

Het prostaatcarcinoom is gekenmerkt door een zeer hoge activiteit van zure fosfatase. Dit is hét voorbeeld van een tumor, die gekarakteriseerd wordt door de activiteit van een bepaald enzym.

De adenocarcinomen van verschillende gedeelten van de tractus digestivus zijn met behulp van de twee methoden voor fosfatasen niet van elkaar te onderscheiden. Wel kan de methode voor alkalische fosfatase van practisch belang zijn, als men voor de vraag komt te staan of een adenocarcinoom in de long een primaire longtumor is of een metastase van een adenocarcinoom van de tractus digestivus. Is er duidelijke activiteit van alkalische fosfatase in de tumorcellen, dan is de laatste mogelijkheid voorlopig uitgesloten. De onderzochte adenocarcinomen, die hun oorsprong hebben in de long, hadden een vrij sterke activiteit van alkalische fosfatase (afb. 22). Wel moet men rekening houden met een eventuele metastase van een hypernephroom, maar in onze gevallen was hierin de activiteit van alkalische fosfatase niet zo hoog als in de primaire pulmonale adenocarcinomen.

Een enkel gezwel, namelijk het chorionepithelioom, wordt gekenmerkt door hoge activiteit van zowel alkalische- als zure fosfatase. De andere tumoren met ongeveer even grote activiteit van zure fosfatase onderscheiden zich van het chorionepithelioom door het ontbreken van activiteit van alkalische fosfatase in de tumorcellen. Wel is er in deze tumoren (carcinoid van de long en de darm, phaeochromocytoom, paraganglioom, bijschildklieradenoom) een opvallend sterke activiteit van alkalische fosfatase in de endotheelcellen van de capillairen.

Een ander voorbeeld van de mogelijkheid om gezwellen op grond van de activiteit van een enzym te onderscheiden is te vinden als men de activiteit van zure fosfatase in gevallen van lymfo-reticulaire maligniteit beschouwt.

TABEL Va5

Activiteit van zure fosfatase in gevallen van lymforeticulaire maligniteit

	Cellen met hoge activiteit van zure fosfatase
normale lymfeklier	Talrijke reticulumcellen rond de follikels, enkele reticulumcellen in de follikels (afb. 45).
morbus Hodgkin	Groepen reticulumcellen en reuzencellen met ertussen verspreid losliggende reticulumcellen.
reticulumcelsarcoom	Dicht opeenliggende, maar regelmatig verdeelde reticulumcellen (afb. 29).
lymfatische leukaemie morbus Kahler	Regelmatig verspreide, verder uiteenliggende reticulumcellen.
lymfosarcoom	Geen of slechts enkele reticulumcellen met zure fosfatase activiteit (afb. 28).

Aan de hand van de activiteit van zure fosfatase kan een onderscheid gemaakt worden tussen lymfo-reticulaire maligniteit, die overwegend bestaat uit reticulumcellen (reticulumcelsarcoom, Hodgkin) en lymfo-reticulaire maligniteit, waarin slechts enkele reticulumcellen zijn opgenomen (Kahler, lymfatische leucaemie, lymfosarcoom). In coupes, die op de gebruikelijke wijze gekleurd zijn, kan dit onderscheid moeilijk zijn.

Bij de ziekte van Hodgkin en het reticulumcelsarcoom is in de meeste reticulumcellen hoge activiteit van zure fosfatase waar te nemen. Bij de ziekte van Hodgkin liggen deze reticulumcellen in groepen bijeen. Ook de reuzencellen van Sternberg bevatten veel zure fosfatase, zodat conglomeraten van cellen met veel bruinzwart neerslag in het protoplasma te zien zijn.

In het reticulumcelsarcoom liggen de reticulumcellen met activiteit van zure fosfatase regelmatig verspreid en dicht opeen in het tumorweefsel.

Bij de ziekte van Kahler, lymfosarcoom en de lymfatische leukaemie zijn slechts enkele reticulumcellen aanwezig, die door de activiteit van zure fosfatase echter direct in het oog springen.

Bovendien is het mogelijk om in gevallen, waarin het onderscheid tussen reticulumcelsarcoom en anaplastisch carcinoom moeilijk is, aan de hand van de verdeling van de cellen met zure fosfatase activiteit tot een beslissing te komen.

Dit kan het best toegelicht worden aan de hand van enkele afbeeldingen.

In het reticulumcelsarcoom liggen sterk positieve cellen regelmatig verspreid dicht opeen in het gezwelweefsel (afb. 29). Als het een anaplastisch carcinoom betreft, vindt men in het gezwelweefsel groepen macrofagen met hoge activiteit van zure fosfatase tussen de velden en strengen vrijwel negatieve gezwelcellen (afb. 30).

Het is te verwachten, dat bij gebruik van meer histochemische methoden voor enzymen een verdere karakterisering van tumoren is te verkrijgen (Willighagen 1960). Hierbij is ons reeds gebleken, dat er ook andere enzymen zijn, die kenmerkend zijn voor een bepaalde gezwelsoort. Een voorbeeld hiervan is de hoge activiteit van aminopeptidase in maagcarcinomen en carcinomen van de galwegen (Willighagen en Planteydt (1959)).

Ad b. **Verband tussen enzymactiviteit en differentiatiegraad**

Verschillen in enzympatroon tussen tumoren van eenzelfde weefsel zouden kunnen samenhangen met de differentiatiegraad van de tumor. Indien het tumorweefsel dezelfde enzymen bevat als de cellen, waaruit het vermoedelijk

is ontstaan, kunnen we dit opvatten als een kenmerk, dat de moedercel bezat, en dat de gezwelcellen hebben behouden.

Wanneer in de gezwelcellen een enzym, dat in de moedercel aanwezig is, niet is aan te tonen, gelijken de gezwelcellen dus minder op de moedercellen, wat wij beschouwen als een uiting van anaplasie.

Bij enkele soorten van gezwellen konden we inderdaad waarnemen, dat de morfologische differentiatie en de overeenkomst in enzymactiviteit parallel gingen. Dat wil zeggen, dat in de tumoren, die goed gedifferentieerd zijn, de enzymactiviteit te vergelijken is met die in de „moedercellen", en dat in de onrijpe tumoren de enzymactiviteit lager is of geheel ontbreekt.

TABEL Va6

Activiteit van zure fosfatase in tumorcellen vergeleken met „moedercellen"

ZEER HOGE ZURE FOSFATASE ACTIVITEIT

prostaatcarcinoom, ook in normale prostaat

HOGE ZURE FOSFATASE ACTIVITEIT

a. In „moedercel" een hoge actitviteit
chorionepithelioom vergeleken met trofoblast
histiocytoom vergeleken met histiocyt, onderdeel RES
cylindroom vergeleken met mucineuze kliercellen

b. In „moedercel" een lagere activiteit
mammacarcinoom vergeleken met epitheelcellen van de afvoergangen
overgangscellencarcinoom vergeleken met overgangsepitheel van de afvoerende urinewegen

LAGE ZURE FOSFATASE ACTIVITEIT

a. In „moedercel" een lage activiteit
fibroom, fibrosarcoom, sarcoom
leiomyoom
neurofibroom

b. In „moedercel" een hoge activiteit
adenocarcinoom van de maag
adenocarcinoom van het colon

In dit verband is interessant de activiteit van alkalische fosfatase in bindweefselgezwellen.

In de fibromen en neurofibromen, die wij onderzochten namen we geen activiteit van alkalische fosfatase waar in de tumorcellen (afb. 19). Wel was er activiteit in de endotheelcellen van de capillairen. Fibromen zijn opgebouwd uit goed gedifferentieerde cellen, die het type hebben van fibrocyten; het

gezwelweefsel is rijk aan collagene vezels. In normale fibrocyten is geen alkalische fosfatase aan te tonen, en het ontbreken van alkalische fosfatase activiteit in fibromen is dus in overeenstemming met de differentiatie der tumorcellen.

In tegenstelling hiermee zijn spoelcelsarcomen opgebouwd uit cellen, die het karakter hebben van fibroblasten. De rijkdom aan collagene vezels is gering. In de cellen van deze tumoren bestond steeds sterke activiteit van alkalische fosfatase (afb. 20). Dit is in overeenstemming met de hoge activiteit in normale fibroblasten. Ook hier komt dus het enzymgehalte overeen met de morfologische differentiatiegraad van de tumorcellen.

Wij onderzochten tevens een aantal fibrosarcomen van de huid en enkele neus-keelfibromen. In de fibrosarcomen was soms wel, soms geen activiteit van alkalische fosfatase aan te tonen. Morfologisch waren er slechts geringe verschillen. De fibrosarcomen met activiteit van alkalische fosfatase waren tamelijk celrijk en vezelarm. In de fibrosarcomen zonder enzymactiviteit waren de cellen mogelijk iets meer uitgerijpt en was er meer vezelvorming. De mogelijkheid bestaat, dat als in fibrosarcomen de morfologische verschillen gering zijn, de activiteit van alkalische fosfatase een kenmerk is voor de onrijpheid van de gezwelcellen. In de onderzochte neus-keelfibromen bestond een duidelijke antiparalleliteit tussen de morfologische rijpheid en de activiteit van alkalische fosfatase. Het neus-keelfibroom met alkalische fosfatase was opgebouwd uit onrijpe cellen van het fibroblast-type, in het neus-keelfibroom zonder enzymactiviteit hadden de cellen het karakter van fibrocyten.

Nog minder gedifferentieerd zijn de rondcelsarcomen. Plaatselijk hebben in deze tumoren de cellen nog het karakter van fibroblasten, maar de meeste delen van het gezwelweefsel zijn opgebouwd uit afgeronde tumorcellen. In de rondcellige delen ontbreekt de activiteit van alkalische fosfatase, in de delen, die nog spoelvormige cellen bevatten, is enzymactiviteit aanwezig (afb. 21).

Het verband zoals wij dat veronderstellen tussen de activiteit van alkalische fosfatase in de tumorcellen en de rijpheid van de tumorcellen in bindweefseltumoren is in het volgend schema samengevat:

Schema

gezwelcellen	rondcelsarcoom	spoelcelsarcoom	fibrosarcoom		fibroom
alkalische fosfatase	−	+	+	−	−
normale cellen	„mesenchymcel"		fibroblast		fibrocyt

Een ander voorbeeld van activiteit van een enzym in een tumor, die parallel

gaat met de differentiatie, is de activiteit van zure fosfatase in tumoren van het colon.

In het normale colon slijmvlies is er een duidelijke activiteit van zure fosfatase waar te nemen, die tot uiting komt in een grof korrelig bruinzwart neerslag apicaal in de epitheelcellen.

In de papillomen van het colon is eveneens een dicht korrelig bruinzwart neerslag aanwezig in de apicale delen van de epitheelcellen. In de adenocarcinomen echter is de activiteit van geval tot geval verschillend. Deze activiteit is steeds lager dan in het normale slijmvlies of in papillomen van het colon, maar meestal nog wel apicaal gelegen. In een deel van de adenocarcinomen van het colon en in de anaplastische carcinomen van het colon is de activiteit van zure fosfatase minimaal. In de solide tumoren liggen vaak enkele bruinzwarte korrels onregelmatig verspreid door het protoplasma.

Het zal belangrijk zijn in de toekomst te onderzoeken in hoeverre er een verband bestaat tussen de differentiatiegraad, zoals die tot uiting komt in de activiteit van enzymen in tumoren, en hun klinische eigenschappen bijvoorbeeld de neiging tot metastaseren, de overlevingsduur van de patiënt, de gevoeligheid voor bestraling enz.

Ad c. **Betekenis van histochemisch enzymonderzoek voor de biochemie**

Bij kwalitatief histochemisch enzymonderzoek komt steeds tot uiting, dat de biochemische eigenschappen van de verschillende cellen, die samen een weefsel vormen, verschillend zijn.

In normale weefsels zijn niet alleen verschillen in enzymactiviteit tussen de celsoorten waar te nemen, maar ook tussen gelijksoortige cellen. Zo verschillen parenchymcellen van de lever onderling in de activiteit van bepaalde enzymen.

Met dit feit, dat verschillen bestaan in cellen, die overigens morfologisch gelijk zijn, wordt bij biochemisch onderzoek van weefsels niet altijd voldoende rekening gehouden.

Ook in gezwelweefsel zijn er verschillen in enzymactiviteit in verschillende delen van de tumor. In tabel Va1 in dit hoofdstuk zijn een aantal gezwellen vermeld, waarvan de cellen alleen plaatselijk alkalische fosfatase bevatten.

Van belang is de waarneming van Pearson c.s. (1950), dat bij de ontwikkeling van het botergeel-hepatoom van de rat, de activiteit van alkalische fosfatase in het begin van het proces berust op de activiteit in het proliferende bindweefsel en in de polynucleaire leucocyten. Pas bij de verdere ont-

wikkeling van de tumoren ontstaat ook activiteit van alkalische fosfatase in een deel van de tumorcellen.

Indien men uitsluitend gehomogeniseerd weefsel had onderzocht zou men niet ontdekt hebben, dat in het begin van het proces de toeneming van de activiteit berustte op de reactieve bindweefselvorming en pas later op de groei van tumorcellen, die alkalische fosfatase bevatten.

De biochemicus heeft dus in histochemische methoden, niet alleen van enzymen, de mogelijkheid van contrôle op de homogeniteit van het onderzochte materiaal.

HOOFDSTUK Vb

SYSTEMATISCHE BESCHRIJVING VAN ALKALISCHE EN ZURE FOSFATASE IN GEZWELLEN

De gezwellen worden beschreven in de volgorde van de coderingslijst van het Pathologisch Laboratorium. Deze lijst is te vinden aan het eind van de illustraties.

Betekenis van de gebruikte symbolen:

—	: geen enzymactiviteit in de gezwelcellen
±	: zwakke enzymactiviteit in de gezwelcellen
+, ++, +++	: geschatte enzymactiviteit in de gezwelcellen
loc. +	: enzymactiviteit in een deel van de gezwelcellen

14 *Venae en capillairen*

15 *Lymfevaten*

diagnose	aantal gevallen	alkalische fosfatase	zure fosfatase
capillair haemangioom	4	loc. +	±
lymfangioom	1	—	±
haemangio-endothelioom	1	—	±
haemangio-pericytoom	1	—	±

Alkalische fosfatase

In de capillaire haemangiomen zijn twee capillair delen onderscheiden, het capillair net van het stroma van het haemangioom en de prolifererende capillairen van de tumor. Het vaatendotheel van de capillairen in het stroma bevat alkalische fosfatase. In de endotheelcellen van de capillairen van het haemangioom was deels wel, deels geen activiteit van alkalische fosfatase te zien (afb. 8).

De tumorcellen in het haemangio-pericytoom en het haemangio-endothelioom bevatten geen

alkalische fosfatase. Wel was er activiteit van alkalische fosfatase in de capillairen en kleinere venen en arteriën van deze tumoren. De cellen van deze vaatjes zijn echter niet te beschouwen als tumorcellen.

Zure fosfatase

De activiteit van zure fosfatase was gering in de endotheelcellen van de capillairen, in het stroma en eveneens in de endotheelcellen van de capillairen van het haemangioom. Ook in de tumorcellen van het haemangio-endothelioom en het haemangio-pericytoom was de activiteit van de zure fosfatase gering.

diagnose	aantal gevallen	alkalische fosfatase
polycythaemie met myeloide reactie	3	++ tot +++ in bijna alle rijpe polynucleaire leucocyten
chronische myeloide leukaemie	2	in geen enkele bloedcel is enzymactiviteit waar te nemen
chronische lymfatische leukaemie	1	deel van de rijpe polynucleaire leucocyten is positief
congenitale haemolytische anaemie	1	klein deel van de rijpe polynucleaire leucocyten is positief
normale donores	6	polynucleaire leucocyten 0 tot 30% positief

In het materiaal dat wij onderzochten, was het mogelijk met behulp van de activiteit van alkalische fosfatase, de myeloide reactie van de chronische myeloide leukaemie te onderscheiden.

Wachstein (1946) zag reeds, dat bij chronische myeloide leukaemie slechts enkele van de rijpere polynucleaire leucocyten alkalische fosfatase bevatten. Bij lymfatische leukaemieën zag hij, dat in rijpere polynucleaire leucocyten wel activiteit van alkalische fosfatase is waar te nemen.

Valentine en Beck (1951) bepaalden kwantitatief de activiteit van alkalische fosfatase in extracten van polynucleaire leucocyten. Ook zij vonden een opvallend lage activiteit bij chronische myeloide leukaemie, een hoge activiteit bij myeloide reacties. Frost (1955), Wiltshaw en Moloney (1955), Boivin en Robinaux (1956) konden door middel van de histochemische reactie op alkalische fosfatase, chronische myeloide leukaemie en myeloide reacties onderscheiden. Bij chronische myeloide leukaemie bevatten soms slechts enkele rijpe polynucleaire leucocyten alkalische fosfatase. By myeloide reacties was in de meeste rijpe polynucleaire leucocyten sterke activiteit van alkalische fosfatase te zien.

Zure fosfatase

De activiteit van zure fosfatase is in polynucleaire leucocyten gering, en verandert niet duidelijk in pathologische omstandigheden.

17 *Lymfeklieren*

18 *Milt*

diagnose	aantal gevallen	alkalische fosfatase	zure fosfatase
maligne granuloom (Hodgkin)	5	—	veel dicht opeenliggende reticulumcellen in granulomen ++/ +++
plasmocytoom (Kahler)	3	—	enkele ver uiteenliggende cellen +++
reticulumcelsarcoom	15	—	veel dicht opeenliggende cellen +++
lymfatische leukaemie	1	—	weinig reticulumcellen +++
lymfosarcoom	2	—	slechts een heel enkele reticulumcel +++

Alkalische fosfatase

De tumorcellen bevatten in geen van de onderzochte gevallen alkalische fosfatase. Wel was er activiteit in de endotheelcellen van de vaten.

Zure fosfatase

Bij de in bovenstaande tabel genoemde aandoeningen is een sterke activiteit van zure fosfatase in de normale en pathologische reticulumcellen waar te nemen. De reticulumcellen bij de ziekte van Hodgkin en gevallen van maligne reticulose, bevatten evenals normale reticulumcellen zeer veel zure fosfatase. Ze liggen bij de ziekte van Hodgkin in groepen bijeen en zijn niet alle even sterk positief. Bij de gevallen van reticulumcelsarcoom liggen de sarcoomcellen met sterke activiteit van zure fosfatase regelmatig verspreid (afb. 29). Bij de ziekte van Kahler en gevallen van lymfatische leukaemie zijn de reticulumcellen, die verspreid tussen de woekeringen van plasmacellen en lymfoblasten liggen, door hun hogere activiteit van zure fosfatase goed te onderscheiden van de tumorcellen. Bij de twee laatste afwijkingen liggen de cellen met activiteit van zure fosfatase verder uiteen dan bij het reticulumcelsarcoom het geval is. In de woekering van het lymfosarcoom bevatten de tumorcellen weinig zure fosfatase. Twee gevallen van lymfosarcoom konden worden onderzocht. Het eerste geval betrof een metastase in de nier, hierin waren geen reticulumcellen aanwezig met activiteit van zure fosfatase. In het tweede geval onderzochten wij een deel van een lymfeklier. Hierin zagen wij verspreid enkele cellen met sterke activiteit van zure fosfatase (afb. 28). Op grond van deze waarnemingen menen wij dus, dat de mogelijkheid bestaat op grond van het aantal reticulumcellen met activiteit van zure fosfatase het lymfosarcoom van het reticulumcelsarcoom te scheiden.

Op de mogelijkheid om het reticulumcelsarcoom van het anaplastisch carcinoom te differentiëren, wezen wij reeds in hoofdstuk Va.

23 *Bronchi*
24 *Long*
25 *Pleura*

diagnose	aantal gevallen	alkalische fosfatase	zure fosfatase
carcinoom van het oatceltype	6	—	± tot +
	1	loc. ±	+
anaplastisch plaveiselcelcarcinoom	27	—	+
plaveiselcelcarcinoom	12	—	±
adenocarcinoom	7	++	+
anaplastisch adenocarcinoom	4	++	+ tot ++
cylindroom van de trachea en hoofdbronchus	3	loc. +	++
longadenoom van het carcinoide type	3	—	++
mesothelioom van de pleura	1	loc. +	+
	3	—	+

Alkalische fosfatase

De gezwelcellen van het plaveiselcelcarcinoom, het anaplastisch plaveiselcelcarcinoom en de gezwellen van het oatceltype bevatten in de meeste gevallen geen alkalische fosfatase. Deze typen gezwellen ontstaan alle drie in de wand van bronchi en worden beschouwd als meer of minder gedifferentieerde plaveiselcelcarcinomen. Daar ook in plaveiselcelcarcinomen van de huid en normaal plaveiselepitheel geen activiteit van alkalische fosfatase is aan te tonen, is de waarneming, dat deze tumoren geen alkalische fosfatase bevatten in overeenstemming met de verwachtingen hierover.

Ook is het begrijpelijk, dat in perifeer gelegen tumoren, zoals het adenocarcinoom van de long, de gezwelcellen wel alkalische fosfatase bevatten (afb. 22). In het epitheel van bronchioli en ook in alveolaire epiheelcellen waar deze tumoren mogelijk van uitgaan, is immers eveneens steeds activiteit van alkalische fosfatase waar te nemen.

Aanvankelijk was de activiteit van alkalische fosfatase in twee anaplastische carcinomen van de long moeilijk te verklaren (afb. 23). Van deze laatste twee tumoren is er één opgebouwd uit protoplasmarijke cellen, met sterke cel- en kernpolymorfie. Er zijn veel reuzencellen.

Wij meenden de activiteit van alkalische fosfatase in anaplastische longcarcinomen te kunnen vergelijken met de activiteit van alkalische fosfatase in anaplastische delen van plaveiselcelcarcinomen van de oesophagus en de portio. In plaveiselcelcarcinomen van de huid zagen we echter tot nu toe nooit activiteit van alkalische fosfatase in de gezwelcellen. De plaveiselcelcarcinomen van de huid waren echter alle goed gedifferentieerd.

Een andere mogelijkheid is, dat de anaplastische longtumoren met activiteit van alkalische fosfatase geen plaveiselcelcarcinomen zijn, maar anaplastische adenocarcinomen. Adenocarcinomen van de long bevatten wel alkalische fosfatase. De laatste mogelijkheid, dat deze anaplastische gezwellen van de long, anaplastische adenocarcinomen zijn, achten wij op grond van recente waarnemingen de meest waarschijnlijke. Wij onderzochten namelijk een dergelijk geval van anaplastisch longcarcinoom waarbij plaatselijk in mestastasen duidelijke atypische buisjes

gevormd werden. Alle gezwelcellen, zowel in de anaplastische delen als in de beter gedifferentieerde delen, bevatten alkalische fosfatase.

In de drie cylindromen was in een deel van de tumorcellen activiteit van alkalische fosfatase waar te nemen (afb. 15). Een analoog beeld zagen wij eveneens in een speekselkliertumor met cylindromateuze delen. Bij de gevallen van mesothelioom van de pleura, zagen wij in één geval activiteit van alkalische fosfatase in een deel van de gezwelcellen.

Zure fosfatase

De activiteit van zure fosfatase in de verschillende vormen van longtumoren was eveneens verschillend sterk. In de goed gedifferentieerde plaveiselcelcarcinomen was de activiteit van zure fosfatase gering. Een zelfde beeld is waar te nemen in de plaveiselcelcarcinomen op andere plaatsen in het lichaam. De activiteit van zure fosfatase in carcinomen van het oatceltype en in de anaplastische plaveiselcelcarcinomen is gemiddeld duidelijk hoger dan in de goed gedifferentieerde plaveiselcelcarcinomen. In adenocarcinomen, cylindroom en bronchusadenoom van het carcinoide type was de activiteit van zure fosfatase vaak zelfs hoog te noemen. De activiteit in het mesothelioom is veel minder sterk.

Op grond van de activiteit van alkalische en zure fosfatase kunnen de longtumoren dus van elkaar worden onderscheiden.

33 *Speekselklieren*

diagnose	aantal gevallen	alkalische fosfatase	zure fosfatase
mengtumoren	2	—	+ tot ++
	4	loc. +	+ tot ++
maligne mengtumor	1	loc. +	++

Alkalische fosfatase

Zoals steeds was er activiteit van alkalische fosfatase in de endotheelcellen van de capillairen te zien. Bovendien waren in vier van de zes mengtumoren en in het adenomateuze carcinoom plaatselijk veldjes, waar in de tumorcellen activiteit van alkalische fosfatase aanwezig was. In de mengtumoren waren dit epitheliale delen; enige van deze veldjes hadden cylindromateuze bouw.

Zure fosfatase

Diffuus in alle tumorcellen was er enige zure fosfatase activiteit. In de epitheliale delen van de tumoren is de enzymactiviteit het sterkste.

36 *Slokdarm*

diagnose	aantal gevallen	alkalische fosfatase	zure fosfatase
plaveiselcelcarcinoom	2	loc. +	±
	1	—	±

Alkalische fosfatase

In de drie onderzochte oesophaguscarcinomen waren goed gedifferentieerde gedeelten aanwezig, waarin geen activiteit van alkalische fosfatase was waar te nemen, doch daarnaast troffen we in twee gevallen delen aan, waarin activiteit van alkalische fosfatase in de tumorcellen bestond. Dit is in tegenstelling met wat gevonden werd in plaveiselcelcarcinomen van de huid en de larynx, hierin zagen wij nooit activiteit van alkalische fosfatase in de tumorcellen (afb. 13). Deze plaveiselcelcarcinomen waren echter alle goed gedifferentieerd. We hebben dus de indruk, dat evenals in normaal plaveiselepitheel in goed gedifferentieerde plaveiselcelcarcinomen geen alkalische fosfatase voorkomt. Daartegenover staat, dat in anaplastische delen van plaveiselcelcarcinomen van de oesophagus wel alkalische fosfatase activiteit is aan te tonen (afb. 14).

Zure fosfatase

Evenals in plaveiselcelcarcinomen in andere organen is de activiteit van zure fosfatase in de tumorcellen van de onderzochte tumoren van de oesophagus gering tot matig.

37 *Maag*

diagnose	aantal gevallen	alkalische fosfatase	zure fosfatase
adenocarcinoom	12	— (2 loc. +)	+ tot ++
anaplastisch carcinoom	5	—	+
scirrheus carcinoom	18	—	± tot +

Alkalische fosfatase

In normaal maagslijmvlies zien we geen activiteit van alkalische fosfatase in de epitheelcellen. Wel zien we alkalische fosfatase in het apicale deel van de epitheelcellen in de zogenaamde intestinale metaplasie. In een enkel geval van adenocarcinoom was locaal activiteit van alkalische fosfatase in het apicale deel van de tumorcellen te zien. Behalve activiteit van alkalische fosfatase in de endotheelcellen van de kleinere vaten was er vaak ook sterke enzymactiviteit aan te tonen in de fibroblasten in het stroma van maagcarcinomen.

Zure fosfatase

De activiteit van zure fosfatase in de cellen van de onderzochte maagtumoren is wisselend in intensiteit. In het algemeen was de activiteit van zure fosfatase in de cellen van het adenocarcinoom van de maag vrij hoog. De enzymactiviteit in anaplastische en scirrheuze maagcarcinomen was in het algemeen niet zo sterk.

40 *Dunne darm*

diagnose	aantal gevallen	alkalische fosfatase	zure fosfatase
adenocarcinoom	2	—	+
carcinoid	3	—	++

Alkalische fosfatase

Het adenocarcinoom van de dunne darm heeft morfologisch hetzelfde aspect als het adenocarcinoom van de dikke darm. Ook de activiteit van alkalische en zure fosfatase was in de onderzochte adenocarcinomen van de dunne darm dezelfde als in de adenocarcinomen van de dikke darm. Op grond van deze morfologische- en histochemische overeenkomsten zouden wij kunnen veronderstellen, dat de adenocarcinomen in de dunne darm ontstaan uit epitheelmetaplasiën, die de opbouw van colonslijmvlies hebben. In het tweede geval van adenocarcinoom van de dunne darm, dat wij onderzochten, zagen we bovendien, dat het slijmvlies in de nabijheid van de tumor niet te onderscheiden was van dikke darmslijmvlies. Beide onderzochte tumoren waren gelocaliseerd in het distale deel van het ileum. Of onze veronderstelling over de pathogenese van het adenocarcinoom van de dunne darm ook opgaat voor de zeer zeldzame adenocarcinomen in duodenum en jejenum weten wij niet, daar wij niet in de gelegenheid waren tumoren uit dit gebied histochemisch te onderzoeken.

De cellen van het carcinoid bevatten geen alkalische fosfatase. De argentaffinecellen in de darm, waar deze tumoren van uitgaan, bevatten evenmin alkalische fosfatase. Opvallend is wel de rijkdom aan capillairen in deze tumoren, waarvan de endotheelcellen alkalische fosfatase bevatten. Dit is een typisch aspect, dat eveneens waar te nemen was in sommige andere gezwellen met endocriene eigenschappen. Voorbeelden hiervan zijn adenomen van de glandulae parathyroideae, het chemodectoom en het phaeochromocytoom.

Zure fosfatase

De activiteit van zure fosfatase in de tumorcellen van beide onderzochte adenocarcinomen was gering. In de cellen van het carcinoid was de activiteit van zure fosfatase sterk. Deze activiteit is sterker dan in de meeste andere tumoren. Een zelfde sterke activiteit van zure fosfatase zagen we eveneens in het phaeochromocytoom, het adenoom van de bijschildklier en het chemodectoom. De activiteit van zure fosfatase was echter niet te vergelijken met die in prostaat klierbuizen of prostaat carcinoom. In dit weefsel is de activiteit van zure fosfatase veel sterker. In coupes van prostaatcarcinoom zien wij reeds na zeer korte incubatietijden zeer dichte neerslagen van loodsulfide, terwijl in de genoemde groep gezwellen de activiteit van zure fosfatase pas na de gebruikelijke incubatietijden van 2, resp. 4 uur, opvallend sterk zijn, vergeleken met andere gezwellen. In de argentaffinecellen van de darm is bij de mens de activiteit van zure fosfatase niet opvallend sterk. Bij de aap daarentegen is de activiteit van zure fosfatase in de argentaffinecellen opvallend hoog.

41 *Colon*

43 *Rectum*

diagnose	aantal gevallen	alkalische fosfatase	zure fosfatase
adenocarcinoom van het colon	35	—	±/+
adenocarcinoom van het rectum	25	—	±/+
papilloom van het colon en het rectum	9	—	++

Alkalische fosfatase

Noch in de adenocarcinomen van het colon en het rectum, noch in de papillomen van het rectum was activiteit van alkalische fosfatase in de gezwelcellen aantoonbaar. In de capillairen en in de fibroblasten, die in het tumorstroma liggen, was zoals steeds activiteit van alkalische fosfatase aanwezig. In een tweetal adenocarcinomen van het colon zagen wij activiteit van alkalische fosfatase in het slijm in de klierbuizen van de tumor. In normaal dikkedarmslijmvlies is er evenmin activiteit van alkalische fosfatase in de epitheelcellen. Wel is er in het slijm, dat in het buitenste deel van de crypten tegen het celoppervlak ligt, activiteit van alkalische fosfatase waar te nemen. Deze activiteit is niet steeds even sterk en kan zelfs ontbreken.

Zure fosfatase

De activiteit van zure fosfatase is in de adenocarcinomen van de dikke darm een enkele maal ongeveer even sterk, meestal echter zwakker dan in het normale epitheel van de dikke darm (afb. 36, 37). In het epitheel van de onderzochte papillomen van het rectum, was de activiteit van zure fosfatase sterker dan in het epitheel van de adenocarcinomen (afb. 35). Ze was ongeveer even sterk of iets sterker dan in normaal darmslijmvlies (afb. 34).

44 *Lever*

diagnose	aantal gevallen	alkalische fosfatase	zure fosfatase
primair levercarcinoom, hepato-cellulair	1	++	+
cholangio-cellulair	1	~	+

Alkalische fosfatase

In het primaire levercarcinoom van het hepato-cellulairetype, dat we onderzochten, was een sterke alkalische fosfatase activiteit in alle tumorcellen aan te tonen (afb. 16). Het was in onze reeks een van de tumoren met de sterkste activiteit van alkalische fosfatase. De tumor bestaat uit strengen en velden veelhoekige cellen. Er worden geen buisjes gevormd. In de tumorcellen is eveneens glycogeen aanwezig, dit wordt door Hou en Fatzeau (1956) beschreven als typerend voor primair levercarcinoom. Zij onderzochten tumoren in leverbiopsiën en vonden alleen glycogeen in de tumorcellen van het primaire levercarcinoom en niet in die van metastatische tumoren.

In de tumorcellen van het carcinoom van het cholangio-cellulaire type was geen activiteit van alkalische fosfatase zichtbaar te maken. Dit is in overeenstemming met onze waarnemingen in tumoren van de galblaas en de galwegen, die evenmin alkalische fosfatase bevatten.

Zure fosfatase

De activiteit van zure fosfatase in ongeveer even sterk in de tumorcellen, als in de cellen van het in dezelfde coupes aanwezige, normale leverparenchym.

45 *Galblaas*
46 *Galwege*
47 *Pancreas*

diagnose	aantal gevallen	alkalische fosfatase	zure fosfatase
Galblaas, galwegen:			
adenocarcinoom	6	—	+
carcinoma solidum	3	—	+
Pancreaskop:			
adenocarcinoom	3	—	+
insulinoom	1	—	++

Alkalische fosfatase

Er was geen activiteit van alkalische fosfatase aan te tonen in de cellen van deze tumoren, slechts in het vaatenthodeel van de capillairen en kleinere venen en arteriën was alkalische fosfatase aanwezig.

Zure fosfatase

De activiteit van zure fosfatase is in de tumorcellen van deze groep gezwellen ongeveer even sterk als in de normale cellen waaruit men veronderstelt, dat deze tumoren ontstaan (afb. 38, 39). Dit geldt niet alleen voor de tumoren, die uitgaan van het epitheel van de galgangen en de afvoergangen van het pancreas, maar eveneens voor het insulinoom, dat opgebouwd was uit β cellen. In dit verband dient het werk van Gössner vermeld te worden, die vergelijkend histochemisch enzym onderzoek heeft gedaan in de eilandjes van Langerhans van verschillende zoogdieren. Hij nam onder andere waar, dat in de β cellen van de eilandjes een tamelijk sterke activiteit van zure fosfatase aanwezig is, terwijl activiteit van esterase in deze cellen ontbreekt. In de α cellen daarentegen ontbreekt de activiteit van zure fosfatase, maar is wel activiteit van esterase aan te tonen. Gössner onderzocht bovendien een geval van een insulinoom, dat opgebouwd was uit αcellen. In deze tumor bevatten de cellen wel esterase, maar geen zure fosfatase. Men zou dus verwachten, dat in een insulinoom, dat opgebouwd is uit β cellen, geen esterase en wel zure fosfatase te vinden is. Dit bleek inderdaad het geval. Het is dus mogelijk, om het α cel- en het β celinsulinoom te onderscheiden op grond van de activiteit van zure fosfatase en esterase.

50 *Testis*

diagnose	aantal gevallen	alkalische fosfatase	zure fosfatase
seminoom	10	+	+
carcinoom	2	+	+
teratocarcinoom	1	+	++
chorionepithelioom	1	++	+++
teratoom	1	loc. +	+

Alkalische fosfatase

In het seminoom, het embryonaal carcinoom en het teratocarcinoom was in alle tumorcellen alkalische fosfatase aantoonbaar (afb. 24).

De activiteit van alkalische fosfatase is niet sterk. De enzymactiviteit is vergelijkbaar met de activiteit van alkalische fosfatase in de cellen van verschillende stadia van de spermatogenese in de tubuli seminiferi, die eveneens niet erg sterk is.

In de cellen van het door ons onderzochte geval van chorionepithelioom bij een man was de activiteit van alkalische fosfatase zeer intensief. Deze activiteit is te vergelijken met de activiteit van alkalische fosfatase in de syncytiotrofoblast, die even hoog is.

In het teratoom was in de epitheliale elementen, in het cylinderepitheel van het tractus digestivustype, in het trilhaarepitheel, in het chorioidea epitheel en in het plaveiselepitheel geen alkalische fosfatase aan te tonen. Wel waren in het embryonale mesenchymale weefsel velden met activiteit van alkalische fosfatase aanwezig.

Zure fosfatase

In alle tumoren van de testis was activiteit van zure fosfatase aan te tonen, ongeveer zo sterk als in de cellen in de normale tubuli seminiferi. Slechts in de cellen van het teratocarcinoom en het chorionepithelioom was een sterke, resp. zeer sterke activiteit van zure fosfatase zichtbaar te maken. Een even sterke activiteit van zure fosfatase zagen wij in de cellen van de trofoblast van de placentavlokken.

51 *Epididymis*

diagnose	aantal gevallen	alkalische fosfatase	zure fosfatase
adenomatoide tumor	1	loc. +	++

Alkalische fosfatase

Het epitheel, dat de buisjes bekleedt, bevatte geen alkalische fosfatase. Locaal waren enkele compacte celnesten aanwezig, waarin matig sterke activiteit van alkalische fosfatase was waar te nemen. Ook de endotheelcellen van de capillairen in het fibreus stroma bevatten alkalische fosfatase.

Zure fosfatase

De activiteit van zure fosfatase was in het epitheel vrij hoog. In het stroma was de zure fosfatase activiteit laag.

53 *Prostaat*

diagnose	aantal gevallen	alkalische fosfatase	zure fosfatase
prostaatcarcinoom	15	–	>+++
prostaathyperplasie	15	–	>+++

Alkalische fosfatase

In één geval van prostaatcarcinoom was in enkele tumorcellen enige activiteit van alkalische fosfatase waar te nemen. In de overige onderzochte prostaatcarcinomen was alkalische fosfatase slechts aanwezig in de endotheelcellen van de capillairen en de kleinere vaten. De epitheelcellen bij de gevallen van prostaathypertrofie bevatten evenmin alkalische fosfatase als de epitheelcellen van de normale prostaat.

Zure fosfatase

De sterke activiteit van zure fosfatase in normaal, hyperplastisch of carcinomateus prostaatweefsel is algemeen bekend (afb. 25).

Downey c.s. (1954) bepaalde kwantitatief biochemisch de activiteit van zure fosfatase in hyperplastisch en carcinomateus prostaatweefsel. Hij vond, dat in prostaatcarcinomen de activiteit per gram weefsel het laagst was.

Zure fosfatase activiteit in prostaatweefsel (Downey c.s. 1954)

Hyperplasie	<20 g	663.2 E/gr. weefsel
	20—50 g	637.0 E/gr. weefsel
	>50 g	616.4 E/gr. weefsel
Carcinoom	I	48 E/gr. weefsel
	II	152 E/gr. weefsel

Deze onderzoekingen van Downey c.s. hebben slechts betrekkelijke waarde. De hoeveelheid bindweefsel en spierweefsel in hypertrofieën van de prostaat, kan vrij sterk variëren. Ook in de carcinomen is de hoeveelheid bindweefsel van geval tot geval verschillend. Het verschil in activiteit van zure fosfatase in hyperplasie en carcinoom komt bij histochemisch onderzoek niet tot uiting. Kwantitatieve schattingen bij histochemisch onderzoek zijn slechts beperkt mogelijk. Of er verschil bestaat in activiteit van zure fosfatase in normaal, hyperplastisch en carcinomateus prostaatweefsel kan niet beoordeeld worden.

Indien in tumorweefsel van onbekende oorsprong histochemisch zeer veel zure fosfatase is aan te tonen, betreft het zeker een metastase van prostaatcarcinoom. Ontbreekt zure fosfatase, dan is een prostaatcarcinoom zeer onwaarschijnlijk. Wel moet men hierbij de eis stellen, dat reeds na korte incubatie (30 minuten voor materiaal dat in aceton is gefixeerd en in paraffine is ingebed; 15 minuten voor vriescoupes) sterke activiteit van zure fosfatase is waar te nemen. Bij langere incubatietijden is het verschil tussen de activiteit van zure fosfatase in prostaatcarcinoom en verscheidene andere tumoren met hoge activiteit van zure fosfatase niet zo duidelijk. Wij veronderstellen, dat bij langere incubatietijden in hoog actief weefsel een maximale hoeveelheid loodfosfaat wordt neergeslagen op de plaats van de enzymwerking, en dat hydrolyse van het substraat daardoor moeilijker wordt. Ook in andere tumoren met hoge activiteit van zure fosfatase kan na 4 uur incubatie een bijna maximale hoeveelheid loodfosfaat worden neergeslagen, zodat het verschil in enzymactiviteit dan moeilijk is te beoordelen.

57 *Blaas*

58 *Pyelum (ureter)*

diagnose	aantal gevallen	alkalische fosfatase	zure fosfatase
anaplastisch carcinoom van de blaas	6	—	+ tot ++
papillomateus carcinoom van de blaas	1	—	+
papilloom van de blaas	6	—	+ tot ++
papillomateus carcinoom van de ureter	1	—	+
carcinoom van het pyelum	4	—	+ tot +++

Alkalische fosfatase

Slechts de endotheelcellen van de vaten bevatten alkalische fosfatase. De tumorcellen zijn steeds negatief.

Zure fosfatase

In dit type tumoren wisselt de activiteit van zure fosfatase vrij sterk. In enkele carcinomen van de blaas en het pyelum was de activiteit van zure fosfatase zéér sterk. Dit kan, als men de standaard techniek volgt, bij anaplastische tumoren het onderscheid met het prostaatcarcinoom moeilijk maken. Daarom moet men voor de diagnose prostaatcarcinoom, vast houden aan de verkorte incubatietijden zoals hierboven beschreven.

In papillomen was de activiteit van zure fosfatase in de door ons onderzochte gevallen, steeds minder sterk.

59 *Nier*

diagnose	aantal gevallen	alkalische fosfatase	zure fosfatase
Hypernefroom (Grawitz tumor):			
tubulaire bouw	4	—	+
tubulaire en hypernefroide bouw	7	loc. +	+
Wilms'tumor	3	—	+
mergfibroom	1	—	±

Alkalische fosfatase

Onder de verzamelnaam Grawitz tumoren zijn een aantal niertumoren samengevat met een vergelijkbaar macroscopisch aspect. Deze gezwellen hebben echter niet alle dezelfde microscopische bouw. Als de tumor opgebouwd is uit grote cellen, die op bijnierschorscellen lijken, spreekt men van een hypernefroom. Vaak echter zijn de tumoren opgebouwd uit atypische tubuli en kunnen de hypernefroide cellen geheel ontbreken. In vele Grawitz tumoren zijn beide componenten aanwezig. In de elf Grawitz tumoren die wij onderzochten, waren er in zeven gevallen hypernefroide tumorstructuren aanwezig. In de atypische tubuli was geen activiteit van alkalische fosfatase aan te tonen.

De hypernefroide cellen bevatten alkalische fosfatase. De enzymactiviteit was niet erg sterk. Het cobaltsulfide neerslag wisselde bovendien in intensiteit van cel tot cel, ook in vele tumorcellen van het hypernefroide type was geen activiteit van alkalische fosfatase aan te tonen.

In de onderzochte Wilms'tumoren en het onderzochte fibroom was activiteit van alkalische fosfatase slechts aanwezig in de endotheelcellen van de capillairen.

Zure fosfatase

De activiteit van zure fosfatase is in alle onderzochte Grawitz tumoren ongeveer even sterk. De activiteit van zure fosfatase in de Wilms'tumoren was niet sterk; in beide onderzochte gevallen ongeveer even hoog.

In het onderzochte mergfibroom van de nier was de activiteit van zure fosfatase gering. Ditzelfde zagen wij in fibromen elders in het lichaam.

60 *Ovarium*

diagnose	aantal gevallen	alkalische fosfatase	zure fosfatase
adenocarcinoma papilliferum	4	apicaal +	+
anaplastische carcinoom	4	± tot +	+ tot ++

Alkalische fosfatase

Sommige auteurs hebben reeds eerder vermeld, dat de tumoren van het ovarium alkalische fosfatase bevatten (Arnold en Oech, 1950; Genesi, 1953). Ook in de tumoren van het ovarium, die wij onderzochten, vonden wij activiteit van alkalische fosfatase in de tumorcellen. In twee van de onderzochte tumoren was echter de activiteit van alkalische fosfatase slechts in een deel van de tumorcellen waar te nemen. In de meeste tumorcellen was in deze gevallen geen activiteit van alkalische fosfatase zichtbaar te maken. In het adenocarcinoma papilliferum was de activiteit van alkalische fosfatase in het apicale deel van de cellen gelocaliseerd.

Zure fosfatase

De activiteit van zure fosfatase was in alle tumoren van het ovarium ongeveer even sterk.

63 *Endometrium*
64 *Collum uteri; portio*

diagnose	aantal gevallen	alkalische fosfatase	zure fosfatase
Corpus uteri:			
adenocarcinoom	8	+	+
anaplastisch carcinoom	2	–	+
Portio:			
plaveiselcelcarcinoom	4	–	±
anaplastisch plaveiselcelcarcinoom	2	+	±
Cervix:			
anaplastisch carcinoom, uitgaande van de cervixklieren	1	++	++
„heldere cellen" carcinoom van het corpus uteri	1	–	±
teratoom van de uterus	1	–	+

Alkalische fosfatase

Ons materiaal omvat enkele voorbeelden van de typische carcinomen van endometrium en portio en enkele afwijkingen die men niet zo vaak ziet. Over de activiteit van alkalische fosfatase in uteruscarcinomen staan enkele literatuurgegevens ter beschikking: Atkinson en Gusberg (1948), Stoll c.s. (1951) beschreven de activiteit van alkalische fosfatase in de carcinomen van het endometrium. Ayre (1951) en Stoll c.s. (1951) onderzochten de activiteit van alkalische fosfatase in vagina uitstrijkpreparaten en in portiocarcinoom.

Onze waarnemingen zijn geheel in overeenstemming met die van bovengenoemde onderzoekers.

In de cellen van het goed gedifferentieerde adenocarcinoom van het endometrium was er een sterke activiteit van alkalische fosfatase.

Het anaplastische, ongedifferentieerde carcinoom van het endometrium, waarin geen, of slechts enkele buisjes te zien waren, bevatte slechts plaatselijk alkalische fosfatase.

De carcinomen van de portio lieten een geheel ander beeld zien dan die van het endometrium. Goed gedifferentieerde carcinomen met plaveiselepitheelkenmerken bevatten namelijk, in tegenstelling met goed gedifferentieerde adenocarcinomen van het endometrium, geen alkalische fosfatase. Indien de tumor geen plaveiselepitheelkenmerken heeft, zoals het geval is bij de ongedifferentieerde carcinomen van de portio, bevatten de tumorcellen wel alkalische fosfatase. Deze activiteit kan in alle cellen aan te tonen zijn, soms is ze alleen locaal aanwezig. Het verschil tussen de activiteit van alkalische fosfatase in ongedifferentieerde carcinomen van het endometrium en het ongedifferentieerde carcinoom van de portio kan van betekenis zijn bij de differentiaaldiagnose van deze tumoren. Het aantal tumoren, dat wij zelf konden onderzoeken is echter te gering om hierover een uitspraak te kunnen doen.

Daar onze waarnemingen in overeenstemming zijn met de gegevens uit de literatuur lijkt het echter de moeite waard, dit nader te onderzoeken.

Zure fosfatase

De activiteit van zure fosfatase was in carcinomen van de uterus niet hoog. In de portiocarcinomen en het endometriumcarcinoom, dat opgebouwd was uit heldere cellen, was de activiteit zelfs gering. De hoogste activiteit van zure fosfatase in deze groep gezwellen namen we waar in een anaplastisch carcinoom, dat leek te ontstaan uit het epitheel van klierbuisjes van de cervix. De enzymactiviteit was ongeveer even sterk als in de resten van normale klierbuisjes, die in het tumorweefsel aanwezig waren.

Carcinoom van de portio van de muis

Naar aanleiding van bovenbeschreven waarnemingen, dat in goed gedifferentieerde plaveiselcelcarcinomen van de portio geen activiteit van alkalische fosfatase is aan te tonen en in ongedifferentieerde carcinomen van de portio wel, hebben wij experimenteel verwekt portiocarcinoom van de muis onderzocht.

Om portiocarcinoom bij de muis op te wekken, werkten wij volgens de methode van Reagan c.s. (1955).

In het totaal werden hiervoor 97 vrouwelijke muizen van de C_3H stam gebruikt. Hierbij

wordt een katoenen draad met aan het ene einde een dikke knoop die geïmpregneerd is met 20-methylcholanthreen zodanig aangebracht, dat de knoop op het ostium externum van de portio ligt. Het methylcholanthreen was in een verhouding 1 : 3 met bijenwas vermengd.

Onder narcose wordt deze draad met een stompe naald door de portio gestoken in de uterus. Door een uterushoorn wordt de naald via de buikholte naar de voorste buikwand gevoerd. Het uiteinde van de draad wordt dan op de fascie vastgeknoopt. Het bleek hierbij, dat als de draad te strak werd aangetrokken, de met methylcholanthreen geïmpregneerde knoop op den duur in de portio werd getrokken. Daarom legden wij bij een aantal muizen de knoop op de buitenzijde van de uterus. Inderdaad bleven hierna de geïmpregneerde knopen veel beter op het ostium externum van de portio liggen.

Ter contrôle onderzochten wij een aantal uteri van normale C_3H muizen. Tevens was er een contrôlegroep van dieren, waarbij een knoop was aangebracht, die alleen met bijenwas was geïmpregneerd.

Het materiaal bestond uit de volgende dieren:

24 muizen, met 20-methylcholanthreendraad, die onder de fascie was verankerd.
34 muizen, met 20-methylcholanthreendraad, die op de uterus was geknoopt.
12 muizen, met een draad die alleen met bijenwas geïmpregneerd was.
27 normale muizen.

Reagan c.s. (1955) zag reeds na 7 weken de eerste plaveiselcelcarcinomen van de portio. De meeste tumoren werden echter ontdekt 14 weken na het appliceren van het 20-methylcholanthreen. Daar het ons vooral ook interesseerde op welke wijze carcinoom ontstond, werden alle dieren tussen de 8e en 10e week na het inbrengen van de met 20-methylcholanthreen geïmpregneerde knoop gedood. Er bleken reeds 12 macroscopisch zichtbare tumoren ontstaan te zijn. Bij microscopisch onderzoek werden behalve enkele kleinere plaveiselcelcarcinomen, tevens gebieden met epitheeldysplasie en gebieden, die er uit zagen als carcinoma in situ gevonden.

Dergelijke veranderingen werden uitvoerig beschreven door Von Haam en Scarpelli (1955). Zij induceerden echter deze veranderingen door de portio van C_3H muizen met een 1% oplossing van 3-4 benzpyreen in aceton te penselen.

Alkalische fosfatase

In tegenstelling tot de waarneming bij de portio van de mens, dat onder normale omstandigheden geen activiteit van alkalische fosfatase is aan te tonen, zagen wij deze in het epitheel van de portio van de muis wel. In het epitheel van de vagina en de portio is alkalische fosfatase aanwezig in de afgeplatte verhoornende cellen. In het plaveiselepitheel, dat het cervicaal kanaal bekleed, is echter alkalische fosfatase aanwezig in alle lagen. Duidelijke verhoorning treedt in dit epitheel in normale omstandigheden niet op. De tumoren ontwikkelen zich deels in het epitheel op de portio, deels in het epitheel in het cervicaal kanaal. Enkele malen was er echter epitheelmetaplasie in een uterushoorn, als de met 20-methylcholanthreen geïmpregneerde knoop hier in doorgetrokken was. Zodra er prikkeling van het epitheel in het cervicaal kanaal optreedt, morfologisch gekenmerkt door zwelling van de cellen, verdwijnt de activiteit van alkalische fosfatase. Dit verdwijnen van alkalische fosfatase zagen wij echter ook bij dieren waarbij knopen alleen geïmpregneerd met bijenwas waren aangebracht. In de plaveiselcelcarcinomen was nimmer enige activiteit van alkalische fosfatase aan te tonen. Wij namen dus waar,

dat zowel bij chronische irritatie, als bij gezwelvorming de alkalische fosfatase verloren ging.

Wij zien dus een verlies van alkalische fosfatase reeds in het begin van de tumorvorming. Activiteit van alkalische fosfatase zoals in het anaplastisch plaveiselcelcarcinoom van de mens is waar te nemen, zagen wij bij de gevallen van anaplastisch carcinoom van de portio van de muis niet.

Zure fosfatase

Zowel in normaal plaveiselepitheel van vagina, portio en cervicaal kanaal, is de activiteit van zure fosfatase gering. Bij prikkeling van dit epitheel verandert deze niet. In het plaveiselcelcarcinoom van de portio en de vagina is de activiteit van dit enzym eveneens laag, ongeveer even sterk als normaal.

69 *Mamma*

diagnose	aantal gevallen	alkalische fosfatase	zure fosfatase
			— tot +++
carcinoom	63	—	— tot +++
	9	loc. +	
	4	+	
fibrosarcoom	1	loc. +	±
adenofibroom	9	myoepitheliale cellen +	+
		epitheel —	

Alkalische fosfatase

In de tumorcellen van de meeste door ons onderzochte carcinomen van de mamma (63 van de 76) was geen activiteit van alkalische fosfatase aan te tonen. Slechts in vier carcinomen bevatten alle tumorcellen alkalische fosfatase. In negen van de onderzochte carcinomen waren kleine groepjes tumorcellen (afb. 17) met sterke activiteit van alkalische fosfatase waar te nemen. De tumoren waarin alkalische fosfatase in de tumorcellen aanwezig was, waren alle van het anaplastische type. Activiteit van alkalische fosfatase is in de epitheelcellen van de klierbuisjes en in de epitheelcellen van de afvoergangen van de normale mamma niet aan te tonen. Wel is er steeds duidelijke fosfatase activiteit in de myoepitheliale cellen te zien (afb. 20). Het is dus merkwaardig, dat een deel van de onderzochte mamma carcinomen alkalische fosfatase bevat. Men veronderstelt immers, dat de mamma carcinomen bij de mens uit melkgangepitheel, dat nimmer alkalische fosfatase bevat, ontstaan.

Wij zouden dus kunnen veronderstellen, dat de cellen in carcinomen van de mamma, die alkalische fosfatase bevatten, uit myoepitheliale cellen zijn ontstaan. Op enkele plaatsen lijkt dit het geval te zijn, maar zekerheid hierover konden wij niet verkrijgen. Het lijkt de moeite waard dit verder te onderzoeken, daar dan op grond van de activiteit van alkalische fosfatase twee typen van mammacarcinoom van verschillende oorsprong zouden zijn te onderscheiden.

Mamma carcinomen neigen sterk tot fibrosering. In de prolifererende fibroblasten is steeds een sterke activiteit van alkalische fosfatase aanwezig. Zodra er hyalinisatie te zien is, is deze fosfatase actitviteit niet meer aan te tonen (hoofdstuk IIIa).

Over de activiteit van alkalische fosfatase in gevallen van carcinoom van de mamma zijn reeds verscheidene publicaties verschenen. Kabat en Furth (1941) onderzochten enkele gevallen. Manheimer en Seligman (1948) zagen tien anaplastische mamma carcinomen en een adenocarcinoom. In geen van deze tumoren was alkalische fosfatase aantoonbaar. Drennan (1952) en Glück (1952) onderzochten resp. 94 en 28 carcinomen van de mamma. Drennan vond in vier anaplastische carcinomen activiteit van alkalische fosfatase. Hij vond geen verband met leeftijd of hormonale behandeling van de patiënt. Glück beschreef drie adenocarcinomen waarin alkalische fosfatase aanwezig was. Nosalevic (1954) zag eveneens in tumorcellen van adenocarcinomen activiteit van alkalische fosfatase. Hij onderzocht 20 carcinomen. Foraker (1956) vond geen activiteit van alkalische fosfatase in mamma carcinomen; hij onderzocht er eveneens 20.

In de gevallen van adenofibroom lijkt het bij oppervlakkige beschouwing, alsof het epitheel alkalische fosfatase bevat. Het zijn echter de myoepitheliale cellen, die evenals in de normale mamma tussen epitheelcellen en stroma liggen, die hiervoor verantwoordelijk moeten worden gesteld. De epitheelcellen zijn echter vaak zo sterk afgeplat, dat het lijkt alsof de myoepitheliale cellen de weefselspleten bekleden. Dit verschijnsel schijnt door andere onderzoekers niet als zodanig te zijn geïnterpreteerd, daar zowel Kabat en Furth (1941) en Glück (1952) menen, dat de epitheelcellen in gevallen van adenofibroom alkalische fosfatase bevatten.

Het onderzochte fibrosarcoom van de mamma bevatte in actief groeiende, celrijke delen, alkalische fosfatase. Het was een fibrosarcoom met een lage maligniteitsgraad, de cellen hadden het voorkomen van fibroblasten. De activiteit van alkalische fosfatase was hiermee in overeenstemming en even sterk als in prolifererende fibroblasten.

Zure fosfatase

De zure fosfatase activiteit in het mammacarcinoom wisselt vrij sterk van tumor tot tumor (afb. 26, 27). In één zelfde tumor is de activiteit van zure fosfatase in alle cellen echter ongeveer even sterk. Wij zagen mammacarcinomen met geringe activiteit van zure fosfatase, maar ook enkele carcinomen met een zeer sterke activiteit van zure fosfatase in alle tumorcellen. Het mammacarcinoom was in ons materiaal het tumortype met de grootste spreiding in activiteit van zure fosfatase. In het epitheel van normale acini en normale afvoergangen is de activiteit van zure fosfatase gering.

Woodard en Moloney (1956) bepaalden de activiteit van zure fosfatase in gehomogeniseerd tumorweefsel en vonden in het mammacarcinoom een hogere activiteit dan in normaal klierweefsel. Om hieruit de conclusie te trekken, dat de tumorcel meer zure fosfatase bevat, dan de normale epitheelcel is niet gemotiveerd. Bij biochemisch onderzoek van gehomogeniseerd weefsel bepaalt men de enzymactiviteit in een aantal celsoorten tezamen; epitheelcellen, bindweefsel, vetweefsel en vaten. In tumorweefsel is de hoeveelheid bindweefsel vaak veel minder dan in normaal weefsel. Bindweefsel bevat zeer weinig zure fosfatase, zodat een lagere activiteit van zure fosfatase in normaal mammaweefsel, dat veel bindweefsel bevat, hierdoor alleen al kan worden verklaard. Met histochemisch onderzoek daarentegen krijgt men een indruk van de enzymactiviteit in de aparte cellen. Daarbij bleek, dat inderdaad in vele gevallen de activiteit van zure fosfatase in mammacarcinoomcellen groter is dan in cellen van het normale epitheel, maar ook, dat in talrijke carcinomen de activiteit van zure fosfatase in de tumorcellen gelijk of slechts weinig hoger is dan in het normale epitheel van afvoergangen en acini.

In de onderzochte adenofibromen is de activiteit van zure fosfatase in de epitheelcellen ongeveer even hoog als in de cellen van het normale epitheel in de mamma.

70 etc. *Zenuwstelsel*

diagnose	aantal gevallen	alkalische fosfatase	zure fosfatase
neurofibroom	3	—	+
ganglioneuroom	3	—	± (ganglioncellen +++)
sympathicoblastoom	5	—	+
glioblastoma multiforme	2	—	±
astrocytoom	2	loc. +	+
ependymoom	1	—	+

Alkalische fosfatase

Een deel van de tumorcellen van het astrocytoom bevatte alkalische fosfatase. In de andere gezwellen van het zenuwstelsel, die onderzocht werden was slechts in de endotheelcellen van de capillairen en kleinere arteriae en venae activiteit van alkalische fosfatase aan te tonen.

Zure fosfatase

In normaal zenuwweefsel is er zwakke activiteit van zure fosfatase in de zenuwvezels. De ganglioncellen bevatten veel zure fosfatase (afb. 12). Ook in de gliacellen is de activiteit van zure fosfatase hoog. De tumoren van het zenuwstelsel, die we onderzochten, bevatten weinig zure fosfatase. De activiteit van zure fosfatase in de cellen van de sympathicoblastomen is sterker dan in de andere onderzochte gezwellen. Opvallend sterk is de activiteit van zure fosfatase in de op ganglioncellen gelijkende cellen in het ganglioneuroom (afb. 33). Dit is een steun voor de opvatting, dat deze cellen ganglioncellen zijn.

80 *Huid*

diagnose	aantal gevallen	alkalische fosfatase	zure fosfatase
mengtumor zweetklieren	1	loc.+	++
carcinoma basocellulare	6	—	— tot +
carcinoma planocellulare	15	—	+
histiocytoom	1	—	+++
papilloom van de penis	1	—	—
naevus	3	—	+/++
melanosarcoom	3	—	++

Alkalische fosfatase

Slechts in de epitheliale delen van een menggezwel, uitgaande van de zweetklieren werd in bepaalde celgroepen activiteit van alkalische fosfatase aangetoond. In de andere, in de tabel

genoemde tumoren, was de activiteit van alkalische fosfatase slechts aan te tonen in de endotheelcellen van de capillairen.

Zure fosfatase

De activiteit van zure fosfatase was in de onderzochte basaliomen en spinaliomen gering. Vaak is de activiteit van zure fosfatase iets sterker in de gepallisadeerde gezwelcellen, die op de grens van de tumorcelnestjes en strengen tegen het stroma aanliggen. In de epitheliale delen van het menggezwel, uitgaande van de zweetklieren was de activiteit van zure fosfatase vrij sterk. De histiocyten van het onderzochte histiocytoom bevatten veel zure fosfatase (afb. 31). In deze histiocyten was vet en ijzer aan te tonen. De waarneming van de sterke activiteit van zure fosfatase in deze histiocyten past dus geheel in het kader van de beschouwingen in hoofdstuk Va, over het verband tussen de activiteit van zure fosfatase en het stapelen van substanties door de cel. In de cellen van naevi was de activiteit van zure fosfatase soms vrij hoog. In de cellen van het onderzochte melanosarcoom eveneens. Dit werd reeds vermeld door Manheimer en Seligman (1955).

diagnose	aantal gevallen	alkalische fosfatase	zure fosfatase
fibroom, fibrosarcoom huid	4	loc. +	+
	14	−	+
verkalkend fibrosarcoom	1	+	+
sarcoom			
spoelcelsarcoom	4	+ tot ++	+
rondcelsarcoom	2	+	+
rhabdomyosarcoom	3	−	++
leiomyosarcoom	1	−	+
myxoliposarcoom	1	−	+
myxoom	2	−	−
myxochondroom	1	+	++
embryoom	1	loc. +	+
neurofibrosarcoom	2	loc. +	−
neurofibromatosis (Recklinghausen)	1	−	−
lipoom	2	−	+
neus-keelfibroom	2	+ tot ++	±
	1	−	±

Alkalische fosfatase

Daar wij in prolifererende fibroblasten steeds activiteit van alkalische fosfatase zagen, zou men ook in tumoren van het bindweefsel alkalische fosfatase verwachten.

In de fibromen van de huid, ontbreekt echter activiteit van alkalische fosfatase in de tumorcellen (afb. 19). Deze tumoren zijn echter opgebouwd uit cellen, die meer op rijpe fibrocyten gelijken, dan op de onrijpere fibroblasten. In vier van de onderzochte gevallen van fibrosarcoom,

slechts weinig kwaadaardige tumoren, was er plaatselijk activiteit van alkalische fosfatase. In een fibrosarcoom van de mamma (69) zagen wij eveneens plaatselijk in de coupe, waar de cellen meer gezwollen waren en de kernen groter en meer ovaal waren, activiteit van alkalische fosfatase in de tumorcellen. In vier sarcomen waarvan de cellen overwegend het spoelceltype hadden, bevatten deze cellen eveneens veel alkalische fosfatase (afb. 20). In andere sarcomen, waarvan de cellen meer afgerond en ongedifferentieerd waren was activiteit van alkalische fosfatase niet aan te tonen (afb. 21). Wij veronderstellen, dat de cellen van deze tumor zo anaplastisch zijn, dat ze geen alkalische fosfatase meer bevatten. Een „verkalkend" fibrosarcoom van de dij, bevatte veel alkalische fosfatase in alle tumorcellen. Het morfologisch beeld verschilde niet duidelijk van dat van de andere fibrosarcomen van de huid. De activiteit van alkalische fosfatase zou er op kunnen wijzen, dat in deze tumor de cellen meer de eigenschappen van fibrosarcomen van het spoelceltype had. Het klinisch verloop van dit geval geeft hiervoor echter geen aanknopingspunten. De tumor recidiveerde niet en 4 jaar na de operatie maakte de patiënt het goed. De activiteit van alkalische fosfatase in delen van de neurofibrosarcomen was analoog aan die in onrijpe mesenchymale tumoren. In de neurofibromatosis, die beschouwd wordt als de rijpere mesenchymale woekering is dan geen activiteit van alkalische fosfatase te verwachten. Deze was inderdaad niet aanwezig. In de overige tumoren uit deze groep, zagen wij slechts alkalische fosfatase in de endotheelcellen van de vaten.

Zure fosfatase

De activiteit van zure fosfatase was in deze tumoren gering tot matig. Alleen in de cellen van de onderzochte rhabdomyosarcomen en een enkel geval van myxochondroom, was hogere activiteit van zure fosfatase aanwezig.

86 *Beentumoren*

diagnose	aantal gevallen	alkalische fosfatase	zure fosfatase
fibroma gigantocellulare (resp. epulis)	5	++	± (reuzenc. ++)
osteogeen sarcoom	4	++	+
chondrosarcoom	1	±	n.o. *
chondroom	3	–	±
osteoblastoma benignum	1	++	n.o. *
exostose	1	++	n.o. *
aneurysmatische beencyste	1	++	reuzencellen
periostaal ossificerend fibrosarcoom	1	++	+

* n.o. = niet onderzocht

Alkalische fosfatase

In de door ons onderzochte beentumoren was behalve in het chondrosarcoom en de chondromen steeds sterke activiteit van alkalische fosfatase waar te nemen (afb. 40). Opvallend is daarbij, dat in de reuzencellen in verscheidene tumoren (fibroma gigantocellulare, osteoblastoma benignum, aneurysmatische beencyste) activiteit van alkalische fosfatase ontbrak (afb. 40).

Bij het geval van exostose was de activiteit van alkalische fosfatase dezelfde als bij de

normale enchondrale verbening. Schajowicz en Cabrini (1954) beschreven de alkalische fosfatase activiteit in een groot aantal bottumoren. Ze kwamen tot de volgende conclusies:

Er is steeds activiteit van alkalische fosfatase in osteoblastische gebieden en in kraakbeen, dat op het punt staat verbeend te worden (normaal en in tumoren). Overal waar abnormale verbening aanwezig is, is de alkalische fosfatase activiteit aanwezig.

Onze waarnemingen zijn grotendeels in overeenstemming met die van Schajowicz en Cabrini. Op één punt kwamen wij tot een afwijkende conclusie. Wij zagen in alle onderzochte reuzencelfibromen een hoge activiteit van alkalische fosfatase. Zij menen, dat deze in de goedaardige vorm van reuzencelfibroom ontbreekt en uitsluitend in de kwaadaardige vorm is aan te tonen.

Zure fosfatase

In weefsel, dat wij ontkalkten volgens de methode, die in hoofdstuk VI beschreven is , was de histochemische methode voor zure fosfatase niet toe te passen. Alleen in tumoren, die zonder voorafgaande ontkalking konden worden gesneden, hebben wij de activiteit van zure fosfatase kunnen bestuderen.

De activiteit van zure fosfatase was in alle onderzochte tumoren gering. Alleen is er een opvallend sterke activiteit van zure fosfatase in de reuzencellen in de gevallen van fibroma gigantocellulare, het osteoblastoma benignum en de aneurysmatische beencyste (afb. 41). Dezelfde sterke activiteit van zure fosfatase zagen wij ook in reuzencellen, van een ander type, namelijk in vreemdlichaam reuzencellen, in Langhans reuzencellen, en in osteoclasten. De activiteit van zure fosfatase in deze reuzencellen beschouwen wij als een aanwijzing, dat deze cellen materiaal hebben opgenomen (hoofdstuk Va).

90 *Schildklier*

diagnose	aantal gevallen	alkalische fosfatase	zure fosfatase
adenoom	5	—	+
carcinoma solidum	10	—	+

Alkalische fosfatase

Evenals in normaal schildklierweefsel is in adenomen en carcinomen van de schildklier slechts alkalische fosfatase activiteit in het vaatendotheel aan te tonen.

Zure fosfatase

De activiteit van zure fosfatase is in alle cellen van adenomen en carcinomen ongeveer even sterk als in de normale epitheelcellen van de schildklierfollikels.

91 *Bijschildklier*

diagnose	aantal gevallen	alkalische fosfatase	zure fosfatase
adenoom	9	—	++

Alkalische fosfatase

De cellen van de bijschildklieradenomen bevatten evenmin als de parenchymcellen van de normale bijschildklieren alkalische fosfatase. De activiteit van alkalische fosfatase in de endotheelcellen is echter hoog, bovendien zijn de adenomen van de bijschildklier rijk aan capillairen. Bij het beschouwen van de coupes van adenomen van de bijschildklier, springt dit sterk in het oog.

Zure fosfatase

Evenals in normaal bijschildklierweefsel is de activiteit van zure fosfatase in de onderzochte adenomen van de bijschildklier hoger dan in de meeste parenchymateuze organen, prostaatepitheel uitgezonderd.

93 *Bijnier*

diagnose	aantal gevallen	alkalische fosfatase	zure fosfatase
phaechromocytoom	8	—	+ tot ++
carcinoom van de bijnierschors	2	+	++
	1	—	++

Alkalische fosfatase

Wij zagen alkalische fosfatase activiteit slechts in de endotheelcellen van de talrijke capillairen. Het aantal capillairen waarvan de endotheelcellen alkalische fosfatase bevatten is opvallend hoog. In twee van de drie onderzochte carcinomen van de bijnierschors bevatten de cellen veel alkalische fosfatase. Beide tumoren produceerden grote hoeveelheden hormonen.

Zure fosfatase

De activiteit van zure fosfatase in de onderzochte phaeochromocytomen en bijnierschorscarcinomen was hoog. Wij namen hoge activiteit van zure fosfatase eveneens waar in sommige andere gezwellen van endocriene organen, zoals in het β-celinsulinoom (47) en in adenomen van de bijschildklier (91).

94 *Hypophyse*

diagnose	aantal gevallen	alkalische fosfatase	zure fosfatase
chromophoob adenoom	1	—	+

Alkalische fosfatase

Wij zagen slechts activiteit van alkalische fosfatase in het vaatendotheel.

Zure fosfatase

De activiteit van zure fosfatase is ongeveer even sterk als in de cellen van normale hypophyse.

diagnose	aantal gevallen	alkalische fosfatase	zure fosfatase
paraganglioom	1	—	++
chemodectoom	2	—	+/++

Alkalische fosfatase

In het onderzochte paraganglioom en de beide gevallen van chemodectoom was een dicht capillairnet aanwezig. In de endotheelcellen van deze capillairen was sterke activiteit van alkalische fosfatase waar te nemen.

Zure fosfatase

In de cellen van het onderzochte paraganglioom en de gevallen van chemodectoom was de activiteit van zure fosfatase hoog (afb. 32).

HOOFDSTUK VI

BESCHRIJVING VAN DE GEBRUIKTE HISTOCHEMISCHE METHODEN

Uitgaande van de door Gomori beschreven methode kwamen wij, op grond van eigen ervaringen en gegevens uit de literatuur, tot de hieronder beschreven methode. Aangezien ogenschijnlijk onbelangrijke gegevens toch invloed kunnen hebben, zijn de handelingen die bij de methode voor alkalische- en zure fosfatase verricht moeten worden, uitvoerig beschreven.

Fixatie: Het te onderzoeken weefsel wordt met een scherp mes in plakjes gesneden, die 1 à 2 mm dik zijn. Een veiligheidsscheermesje is hiervoor zeer geschikt. Vervolgens wordt het weefsel in koude aceton (4° C) gebracht. Eventueel kan men de stukjes eerst op filtreerpapier leggen. De stukjes kleven hieraan vast, waardoor ze, als ze in aceton worden gebracht, vlak blijven liggen en niet krom trekken. Fixatie in aceton veroorzaakt meestal sterke schrompeling. Wij hebben de indruk, dat deze is tegen te gaan door weefselstukjes, nadat ze gesneden zijn, eerst een half uur in verse toestand in een ijskast te leggen om vóór te koelen. Deze schrompeling is vooral te zien in weefsel, dat weinig stroma bevat zoals nier, lever, schildklier, bijnier en hypofyse. Het weefsel wordt vervolgens met koude aceton gewassen om weefselvloeistof en bloed te verwijderen. Daarna zet men de potjes, die om verdampen te voorkomen, afgesloten worden met een schroefdeksel, in de ijskast. Weefsel, dat in verse toestand niet goed in dunne plakjes te snijden is, kan men nadat de aceton ½ à 1 uur heeft ingewerkt, nog bijsnijden. Als men hiermee echter te lang wacht, wordt het weefsel brokkelig en is het bijsnijden niet goed meer mogelijk. Wij hebben uitsluitend met aceton als fixatiemiddel gewerkt, omdat er op weefsel, dat op deze wijze is gefixeerd, meer histochemische enzymmethoden zijn toe te passen. Behalve alkalische- en zure fosfatase kan men er

bijvoorbeeld 5-nucleotidase, esterase en fosfo-amidase in aantonen en localiseren.

Ontwateren: Dit gebeurt eveneens in gekoelde aceton (4° C). Nadat het weefsel 24 tot 48 uur in aceton is gefixeerd wordt de aceton ververst, dit gebeurt 6—12 uur later nogmaals. Het blijkt, dat op deze wijze bewerkte stukjes 7—14 dagen in de ijskast in de aceton kunnen blijven staan, zonder dat de enzymactiviteit merkbaar achteruit gaat. Wel is het noodzakelijk de aangegeven verversingen van de aceton te doen plaats vinden. Een voorraad gekoelde aceton moet derhalve steeds beschikbaar zijn.

Het impregneren met paraffine: Voordat weefselstukjes met paraffine kunnen worden geïmpregneerd, dient de aceton vervangen te worden door een vloeistof die zowel met aceton als met paraffine mengbaar is. Hiervoor gebruiken we petroleum-aether met een kooktraject van 45—60° C. Petroleum-aether met hoger kooktrajct of benzeen is ook goed bruikbaar, maar in verband met de in onze procedure volgende vacuum-inbedding, zijn wij overgegaan op petroleum-aether met laag kooktraject.

De petroleum-aether met het lage kooktraject verdampt bij het inbedden in vacuo sneller, de paraffine kan dan sneller in het weefsel doordringen. Hierdoor kan de tijd, dat de enzymen aan een hogere temperatuur worden blootgesteld, zo kort mogelijk worden gehouden.

De weefselstukjes worden gewassen met petroleum-aether en blijven daarna bij kamertemperatuur één tot twee uur in de petroleum-aether staan, die na een half uur nogmaals wordt ververst. Indien de stukjes niet dikker zijn dan 2 mm, is de petroleum-aether in deze tijd door de gehele stukjes gedrongen en heeft er de aceton vervangen. Nu worden de stukjes in paraffine gebracht, die een smelttraject heeft van plm. 56°—58° C.

Onderzoekingen, o.a. van D a n i e l l i (1946) hebben laten zien, dat vooral tijdens het impregneren met paraffine, het enzym geïnactiveerd wordt. Deze inactivering is een functie van de tijd, zodat het impregneren zo kort mogelijk dient te duren. Daarom zijn dunne stukjes noodzakelijk om tot snelle impregnatie met paraffine te komen. Bovendien is het gewenst het impregneren met paraffine in een vacuum te laten verlopen, waardoor de petroleum-aether door verdamping wordt onttrokken en de paraffine het stukje sneller binnendringt. Teneinde de temperatuur in de paraffine goed in de hand te hebben werd het impregneren in een waterbad uitgevoerd. In eigen bedrijf werd een koperen waterbad vervaardigd, waarin twaalf wijde reageerbuizen (zgn. melktestbuizen) kunnen hangen. In deze buizen vindt het impregnatieproces plaats.

Om de inhoud van de buizen te kunnen inspecteren, is er in de voorzijde van het waterbad een perspexruit aangebracht. In de buizen passen rubber stoppen waardoor glazen buisjes met terugslagbollen zijn bevestigd. Deze glazen buisjes werden met korte vacuumslangen verbonden met een metalen buis met twaalf zijpijpjes. Deze pijp was via een terugslagfles aangesloten op een waterstraalpomp.

Het impregnatieproces gaat nu als volgt: In de buizen giet men gesmolten paraffine. Als de paraffine de temperatuur van het waterbad (plm. 58 à 60° C) heeft aangenomen, kan men de stukjes erin werpen. De stukjes worden omgeven door paraffine, die stolt en dan weer langzaam smelt. Als de paraffine gesmolten is en de stukjes in de paraffine gezonken zijn, kan met het afzuigen van de lucht worden begonnen. Tijdens de vacuumimpregnatie dient de paraffine goed vloeibaar te zijn, maar de temperatuur mag niet boven 60° C stijgen, want boven deze temperatuur wordt het enzym snel geïnactiveerd. De temperatuur moet plm. 2° C boven het smeltpunt van de paraffine blijven; bij lagere temperaturen ontstaat tijdens het afzuigen van lucht en petroleumaether in de reageerbuis paraffineschuim, waardoor de afzuigbuisjes verstopt raken.

Soms ontstaat dit schuim zo plotseling, dat het op een explosie gelijkt. Het weefsel is dan vaak terug te vinden in het vast geworden paraffineschuim boven in de buis, of in de terugslagbol.

In een verder stadium van ons onderzoek hebben wij het weefsel geïmpregneerd in een vacuum droogstoof. De temperatuur is nauwkeurig op 60° C te regelen, als men de deur, waarin zich een ruit bevindt, niet te lang open laat. Het vacuum in deze stoof wordt verkregen met een oliepomp (10 mm Hg). Het weefsel wordt in cylindrische cuvetjes ingebed. In de stoof kunnen er ongeveer 50 tegelijk geplaatst worden. Tevens is in de stoof nog plaats voor een voorraadkan met gesmolten paraffine.

Ook bij het gebruik van de vacuumstoof moet opgepast worden voor schuimvorming en kookvertraging, daar de uit de cuvetjes gespatte stukjes meestal niet goed meer te identificeren zijn. Men kan tijdens deze vacuumimpregnering de paraffine éénmaal verversen, dit is echter niet beslist noodzakelijk. De duur van de impregnering varieert van 15 tot 30 minuten. Hierna worden de weefselstukjes in paraffine ingebed volgens de gebruikelijke techniek, waarbij de paraffine tot blokjes stolt.

De paraffineblokken worden bewaard in de ijskast, of nog beter bij —20° C in een diepvrieskast. In de ijskast zijn deze niet aangesneden paraffineblokken ongeveer 6 maanden houdbaar en in diepvries nog langer, zonder dat de

enzymactiviteit merkbaar terugloopt. Als het blok eenmaal aangesneden is, loopt de enzymactiviteit snel terug. Om dit enigszins tegen te gaan, kan het sneevlak in gesmolten paraffine worden gedoopt, waarna het blok weer in de ijskast bewaard kan worden. Tot aan de phase van het inbedden is de behandeling van de weefselstukjes voor beide enzymen technisch dezelfde. Op de gebruikelijke wijze worden op een paraffinemicrotoom van de blokken coupes gemaakt, die 5 à 8μ dik zijn.

De wijze waarop de coupes op het objectglas worden gebracht, is echter verschillend bij de methoden voor de alkalische en zure fosfatase. Daarom wordt nu eerst de methode voor de alkalische fosfatase besproken, de methode voor de zure fosfatase volgt daarna.

METHODE VOOR ALKALISCHE FOSFATASE

Het op het objectglas brengen van de coupes: De paraffine coupes worden op een waterbad gestrekt. Dit waterbad mag niet te warm zijn. In de eerste plaats omdat hogere temperatuur het enzym inactiveert en in de tweede plaats omdat de coupes gemakkelijk „overstrekken". Dit komt waarschijnlijk doordat bij het inbedden resten petroleum-aether in de paraffine achterblijven. Bij dit „overstrekken" vliegt het weefsel, zodra het in contact komt met het wateroppervlak, in stukjes uit elkaar.

Wij gebruiken een waterbad dat ingesteld staat op circa 30° C.

De coupes worden opgevangen op glaasjes, die zo dun mogelijk ingewreven zijn met eiwit-glycerine. Hiervoor is serum-glycerine zeer geschikt. De objectglazen met de coupes worden in open preparatenmappen aan de lucht te drogen gelegd tot de volgende morgen.

Incubatie in de substraatoplossing: De opgeplakte coupes worden gedeparaffineerd door middel van benzeen; petroleum-aether is hiervoor echter ook geschikt. Vervolgens worden de coupes kort in aceton gespoeld om de benzeen te verwijderen. Het gebruik van alcohol moet hierbij worden vermeden omdat alkalische fosfatase in met water verdunde alcohol enigszins oplost en dus kan wegdiffunderen (Ruyter en Weismann, 1949).

De coupes drogen, als ze uit de aceton komen, snel. Ze kunnen dan via gedestilleerd water, maar eventueel ook direct in het substraat geplaatst worden [1]).

---

[1]) Men kan zonder deparaffineren de coupes direct in de substraat-oplossing brengen, of ze er op laten drijven (Ruyter, Weismann 1949). De incubatietijd moet dan ongeveer dubbel zolang zijn dan wanneer men met gedeparaffineerde coupes werkt. Dit soort drijvende coupes had bij ons de neiging te desintegreren.

Het substraat wordt samengesteld zoals door Gomori (1952) is beschreven. Hierbij deden wij een keus uit talrijke, voornamelijk op ondergeschikte punten in redactie verschillende, voorschriften. Van zeer groot belang is de *hoge calciumconcentratie,* waardoor voorkomen wordt, dat de kernen een fout-positieve alkalische fosfatase reactie laten zien, die op diffusie berust (Gomori, 1952).

De incubatievloeistof bestaat per 100 ml gedestilleerd water uit:

600 mg *natrium β-glycerofosfaat,* het substraat dat door het enzym wordt gesplitst.

2000 mg *calciumchloride,* het afgesplitste fosfaation vormt met calcium bij pH 9.6 het onoplosbare calciumfosfaat.

1000 mg *natriumbarbituraat,* waardoor de substraatoplossing wordt gebufferd op pH 9.6, de pH waarbij alkalische fosfatase optimaal werkzaam is.

10 druppels van een *10% magnesium sulfaatoplossing.* Het magnesiumion is een activator van alkalische fosfatase.

De incubatievloeistof dient steeds vers bereid te worden. Wij gebruiken de laatste tijd als substraat natrium β-glycerofosfaat van B.D.H. (British Drug House). Het gehalte aan α-glycerofosfaat in verschillende monsters β-glycerofosfaat werd in de biochemische afdeling van het pathologisch laboratorium (hoofd Dr. P. van Duijn) onderzocht door Dr A. E. F. M. Meijer. Hij vond tot 55,2% α-glycerofosfaat in door verschillende fabrikanten als β-glycerofosfaat afgeleverde stof. In het monster glycerofosfaat van B.D.H. is slechts ca. 12,5% α-glycerofosfaat aanwezig. Daar de fosfatasen β-glycerofosfaat veel sneller hydrolyseren dan α-glycerofosfaat is het zeker van belang, dat het gehalte aan α-glycerofosfaat van het te gebruiken substraat niet te hoog is.

Voordat de coupes in de incubatievloeistof worden geplaatst, wordt deze oplossing verwarmd tot ca. 45° C en warm gefiltreerd. De temperatuur is na de filtratie plm. 37° C, waarna de oplossing op de gedeparaffineerde coupes kan worden gebracht.

Incubatie. De cuvetten met coupes worden dan gedurende 1 of 2 uur in een broedstoof bij een temperatuur van 37° C geïncubeerd. Steeds worden ook coupes gedurende twee uur geïncubeerd in een oplossing, die dezelfde bestanddelen als de incubatieoplossing, uitgezonderd het substraat, bevat. Deze contrôle wordt uitgevoerd om kalkneerslagen, die reeds in de coupes aanwezig waren of door andere oorzaken dan de enzymwerking zouden ontstaan, te kunnen herkennen. Dergelijke neerslagen zouden anders immers ten onrechte

aan de enzymwerking worden toegeschreven. Men kan ook als contrôlemaatregel de coupes in de complete substraatoplossing incuberen, nadat men de fosfatase heeft geïnactiveerd in kokend water of met een inactivator. Uit de literatuur blijkt, dat men dan dezelfde resultaten verkrijgt als bij de door ons gevolgde procedure. Van elk weefselblokje worden tenminste zes coupes gemaakt, zodat steeds twee coupes gedurende 1 uur en twee coupes gedurende 2 uur in de substraatoplossing en twee coupes gedurende 2 uur in de contrôleoplossing worden geïncubeerd.

Zichtbaar maken van het reactieproduct: Het calcium fosfaat, dat ontstaat op de plaats van de enzymactiviteit, is ongekleurd. Het is slechts met behulp van fasecontrast- of interferentiemicroscopie te zien. Om het reactieproduct zichtbaar te maken wordt de volgende methode gebruikt: De coupes worden gespoeld in met veronal gebufferd aqua dest. (eventueel hard kraanwater), daarna 5 à 10 minuten in een 2% waterige oplossing van cobaltnitraat geplaatst. Het cobaltion verdringt het calciumion voor een groot deel en in de plaats van het neerslag van calciumfosfaat komt een neerslag van cobaltfosfaat te liggen. Hierna wordt de coupe gespoeld in gedestilleerd water. Langer dan twee minuten spoelen brengt het neergeslagen cobaltfosfaat in oplossing, korter spoelen heeft tot gevolg, dat elders in het weefsel resten cobaltnitraat blijven liggen. Als na dit spoelen de coupes in 2% natriumsulfideoplossing worden gebracht, ontstaat onoplosbaar zwart cobaltsulfide op de plaatsen waar zich cobaltfosfaat bevond. De localisatie van de enzymactiviteit, waardoor de fosforzure esters gesplitst worden, wordt dus via neerslagen van calciumfosfaat en cobaltfosfaat als zwarte neerslagen van cobaltsulfide door ons oog waargenomen. Indien na de behandeling met de cobaltnitraatoplossing de coupes te lang waren gewassen, is het beeld flets, indien te kort was gewassen, ontstaat een grijze grondtoon, waarin de enzymwerking moeilijk te localiseren is.

De coupes kunnen worden ontwaterd met aceton en na spoelen in petroleumaether worden afgedekt. In de meeste afdekmiddelen, zoals synthetische harsen, wordt het cobaltsulfide op den duur in een kleurloze verbinding omgezet, zodat de preparaten niet houdbaar zijn. Beter is het daarom gewone canadabalsem of ester-gums te gebruiken (Lillie, 1954).

De coupes kunnen worden nagekleurd om de histochemische localisatie beter te kunnen beoordelen; hiervoor is nakleuring met de kernkleurstof kernechtrood geschikt.

Werkschema van de methode voor de alkalische fosfatase

1e dag: het materiaal wordt dun gesneden, 1 à 2 mm dik, in aceton van 4° C gebracht en vervolgens in de ijskast geplaatst.

2e dag: 's-morgens en 's-avonds de aceton (4° C) verversen.

3e dag: wassen in petroleum-aether, kookpunt 45—60° C, tweemaal een half uur hierin laten staan
impregneren met paraffine onder vacuum, paraffineblokken in ijskast bewaren
van de gekoelde paraffineblokken coupes snijden
opslepen op objectglazen
drogen gedurende de nacht bij kamertemperatuur.

4e dag: deparaffineren in petroleum-aether
spoelen in aceton
1 en 2 uur in substraatoplossing 37° C (samenstelling zie blz. 112)
spoelen in gedestilleerd water
2% cobaltnitraat, 5 à 10 minuten
spoelen in gedestilleerd water, 1 max. 2 minuten
2% natriumsulfide, 2 minuten
spoelen in gedestilleerd water (eventueel tegenkleuren van de celkernen)
ontwateren in aceton, spoelen in petroleum-aether
afdekken.

METHODE VOOR ZURE FOSFATASE

Het op het objectglas brengen van de coupes: Sinds Gomori in 1941 deze methode beschreef, bleek aan degenen, die de methode gebruikten — ook aan Gomori zelf — dat vaak tekenen van enzymactiviteit in de coupes veldsgewijs ontbraken. Als de reactie op dezelfde wijze herhaald werd, werd weer een andere verdeling gevonden, zodat het onmogelijk was reproduceerbare resultaten te bereiken.

Goetsch en Reynolds (1952) verrichtten een uitvoerige analyse van de methode voor zure fosfatase en kwamen tot de conclusie, dat betrouwbare reproduceerbare resultaten te verkrijgen waren, indien de coupes niet met eiwit werden opgeplakt. Zij namen aan, dat het eiwit waarmee de coupes worden opgeplakt een inactivator zou bevatten waardoor de onregelmatige vlek-

kige uitsparingen van de reactie in de coupes verklaard zouden kunnen worden. Tevens brengen deze onderzoekers de coupes in niet-gedeparaffineerde toestand in het substraat. Door de paraffine in de coupes te laten, is de diffusie van het reactieproduct minder en men ziet op de plaats van de enzymactiviteit fijnkorrelige neerslagen.

Wij hebben gewerkt met de methode zoals Goetsch en Reynolds (1952) aangaven. Hiermee worden reproduceerbare resultaten verkregen. De paraffinecoupes worden gestrekt op het waterbad, zoals bij de methode voor de alkalische fosfatase is beschreven. Daar de coupes niet met eiwit of een ander opplakmiddel aan het objectglas gehecht zijn, ziet men soms, dat ze na lange incubatie van 4 uur bij 37° C loslaten. Daarom moeten de objectglazen vooral goed schoon zijn en moet erop gelet worden, dat de coupes zonder plooien op het objectglas liggen. Vervolgens worden de coupes gedurende de nacht in een open preparatenmap te drogen gelegd.

Incubatie in substraatoplossing: De coupes worden geïncubeerd in een substraatoplossing bij een temperatuur van 37° C gedurende twee of vier uur. De incubatievloeistof bestaat uit:

110 m.l. 0.05 M *natriumacetaatbuffer,* pH 5.0
300 mg *natrium β-glycerofosfaat* als substraat
120 mg *loodnitraat.*

Zure fosfatase splitst van natrium β-glycerofosfaat een fosfaation af, dat bij pH 5.0 als loodfosfaat wordt neergeslagen.

De incubatievloeistof wordt vers bereid, door uit te gaan van een voorraadoplossing, die bestaat uit 3 liter 0.2 M natriumacetaatbuffer pH 5.0, waarin reeds loodnitraat is opgelost.

Wij maken deze oplossing door bij drie liter gedestilleerd water 57,2 gram natriumacetaat 3 H_2O, 10,8 ml ijsazijn en 14,4 gram loodnitraat te voegen. De pH wordt gecontroleerd met een pH meter. Om 110 ml incubatievloeistof te verkrijgen voegen wij aan 25 ml voorraadoplossing 85 ml aqua dest. en 300 mg natrium β-glycerofosfaat toe.

De pH van de incubatievloeistof wordt gecontroleerd met indicatorpapier van Merck, zonodig wordt ijsazijn toegevoegd. Een op deze wijze bereide incubatievloeistof wordt troebel, waarschijnlijk door als verontreiniging aanwezige vrije fosfaationen in het glycerofosfaat, waardoor loodfosfaat neerslaat. Deze troebele oplossing wordt verwarmd tot 45° C en warm gefiltreerd. Na filtratie is de temperatuur ongeveer 37° C en wordt het substraat op de

coupes in de cuvette geschonken. Wij gebruiken zgn. ribbeltrogjes, die 19 coupes kunnen bevatten. Evenals voor de alkalische fosfatase worden als contrôle ook coupes in een incubatievloeistof geïncubeerd, die alle bestanddelen bevat behalve glycerofosfaat. Deze bestaat dus uit 85 ml aqua dest. met 25 ml voorraadvloeistof waaraan geen glycerofosfaat wordt toegevoegd. Deze coupes worden verder op dezelfde wijze behandeld als de coupes, die in de complete incubatievloeistof worden geïncubeerd.

Zichtbaar maken van het reactieproduct: Na geïncubeerd te zijn, worden de coupes gespoeld in gedestilleerd water. Vervolgens worden de coupes in een 2% oplossing van natriumsulfide gebracht. Er ontstaan dan bruinzwart loodsulfide op de plaats waar, door de werking van zure fosfatase, loodfosfaat is neergeslagen.

Deze bewerkingen moeten voorzichtig gebeuren, daar de coupes gemakkelijk loslaten, omdat ze zonder plakmiddel op het objectglas zijn gebracht. Eventueel kan men de coupes, als ze uit de incubatievloeistof komen, eerst voorzichtig met gedestilleerd water spoelen en dan drogen in een droogstoof van ± 45° C. De coupes plakken weer vaster op het objectglas en kunnen daarna in de natriumsulfideoplossing worden gebracht. Indien ze in een te warme stoof gedroogd worden, plakken de coupes ook goed, maar smelt de paraffine en dringen de oplossingen die na het droogproces worden gebruikt niet goed meer in de coupes door en is de kleuring onvoldoende.

Vervolgens worden de coupes ontwaterd in aceton en in petroleum-aether gedeparaffineerd. De coupes worden dan direct met canadabalsem afgedekt. Als men de coupes wil nakleuren, moet men eerst weer met een dalende reeks alcoholen naar water doorvoeren en dan bijvoorbeeld met kernechtrood, dat een goed contrast geeft met het bruinzwarte loodsulfide, kleuren.

Werkschema van de methode voor zure fosfatase

1e dag: het materiaal wordt dun gesneden, 1 à 2 mm dik, in aceton van 4° C gebracht en in de ijskast geplaatst.

2e dag: 's morgens en 's avonds aceton (4° C) verversen.

3e dag: wassen in petroleum-aether, kooktraject 45—60° C
tweemaal een half uur hierin laten staan
impregneren met paraffine onder vacuum, paraffineblokken in ijskast bewaren
snijden van coupes van gekoelde paraffineblokken

opslepen op *schone* objectglazen *zonder* opplakmiddelen
drogen bij kamertemperatuur gedurende de nacht.

4e dag: *niet deparaffineren*
2 en 4 uur in de substraatoplossing, 37° C (samenstelling zie blz. 115)
spoelen in gedestilleerd water
2 minuten 2% natriumsulfide, spoelen met gedestilleerd water.
Ontwateren en deparaffineren.
(eventueel nakleuren)
afdekken.

Bewerking van het materiaal: Van het materiaal, dat wij onderzochten, werden steeds serie coupes gemaakt, waarbij naast de coupes waarin de enzymactiviteit werd aangetoond, andere coupes werden gekleurd volgens verschillende methoden. Het grootste deel van het materiaal werd volgens onderstaand schema bewerkt. Alle kleuringen werden in duplo uitgevoerd.

1. haematoxyline-eosine overzichtskleuring.
2. alkalische fosfatase, 1 uur geïncubeerd.
3. alkalische fosfatase, 2 uur geïncubeerd.
4. contrôle alkalische fosfatase.
5. combinatiekleuring: Feulgen thioninereactie op desoxyribonucleinezuren en perjoodzuur-Schiff reactie voor polysacchariden (Van Duijn, 1956).
6. zure fosfatase, 2 uur geïncubeerd.
7. zure fosfatase, 4 uur geïncubeerd.
8. contrôle zure fosfatase.
9. methylgroen-rhodamine S (volgens Trevan en Sharrock, 1951).
10. methylgroen-rhodamine S, nadat de coupes aan de werking van ribonuclease zijn blootgesteld. Met deze kleuring kan men de ribonucleinezuren in het protoplasma en in de nucleolus zichtbaar maken.

Andere gebruikelijke kleuringen, zoals Azan, Van Gieson, Gomori, de colloidale ijzerkleuring voor zure mucopolysacchariden volgens Abul Haj-Rinehart (1952) en de eiwitkleuring volgens Mazia (1953) werden gedaan indien dit voor een verdere analyse noodzakelijk leek.

Fosfatasen in bot of verkalkt weefsel: Om in beenweefsel alkalische fosfatase aan te tonen, dient dit beenweefsel eerst ontkalkt te worden. De calciumzouten in het bot geven namelijk met het cobaltnitraat en het natriumsulfide

dezelfde reactie als het calciumfosfaat, dat bij de enzymreactie ontstaat. Men kan niet met sterke zuren ontkalken, daar deze de alkalische fosfatase inactiveren. Beter zou zijn om te ontkalken met een citroenzuur-buffer (Lorch 1946, 1947; Greep c.s. 1947). Hiermee hebben wij geen ervaring. Freiman (1953, 1954) gebruikte EDTA (aethyleen diamine tetra-azijnzuur). Met deze laatste methode hebben wij goede resultaten verkregen. Na fixatie gedurende 24—48 uur in koude aceton, brengt men de botstukjes, die zo dun mogelijk moeten zijn, 4 à 7 dagen in 5% EDTA oplossing, die een pH van plm. 6.6 heeft. Voor deze oplossing gebruikten wij titriplex (Merck) met NaOH op de juiste pH gebracht. De stukjes worden regelmatig geschud, terwijl de oplossing om de twee dagen ververst wordt. Na de ontkalking worden de stukjes opnieuw in aceton ontwaterd, in paraffine ingebed en gesneden. De coupes worden, voordat ze in de incubatievloeistof worden gebracht, eerst twee uur in een 2% $MgSO_4$ oplossing gebracht, die het enzym reactiveert. Wij waren echter niet in staat om in botstukjes, die ontkalkt waren in EDTA nog zure fosfatase activiteit aan te tonen. Daar wij geïnformeerd wilden zijn over de zure fosfatase activiteit in osteoclasten volgden wij hiervoor een andere werkwijze. Pijpbeenderen van jonge muizen werden zonder voorafgaande ontkalking op de gebruikelijke wijze in aceton gefixeerd en in paraffine ingebed. Het is goed mogelijk om van deze pijpbeenderen, die in paraffine zijn ingebed, coupes te maken. De coupes worden 2 uur in de EDTA-oplossing geplaatst, voordat ze in de incubatievloeistof op de gebruikelijke wijze worden geïncubeerd.

Blijkbaar is kortdurende inwerking van EDTA voor het enzym zure fosfatase niet schadelijk, aangezien het op deze wijze zeer goed mogelijk was activiteit van zure fosfatase zichtbaar te maken.

Fosfatase in vriescoupes van ongefixeerd weefsel: Het grootste deel van ons materiaal werd bewerkt volgens de methoden zoals hierboven beschreven. In een later stadium van ons onderzoek toonden wij activiteit van alkalische en zure fosfatase aan door middel van een andere werkwijze. Hierbij wordt het weefsel aanvankelijk niet gefixeerd, maar worden van het vers verkregen materiaal vriescoupes gemaakt. Deze vriescoupes worden dan al of niet gefixeerd in de incubatieoplossing gebracht. De incubatietijden kunnen dan veel korter genomen worden, daar de gedeeltelijke inactivering van de enzymen, die een gevolg is van het impregneren met paraffine bij 60° C nu wordt vermeden. Voor de alkalische fosfatase zijn incubatietijden van 5 tot 30 minuten, voor de zure fosfatase van 30 tot 60 minuten voldoende.

Deze werkwijze wordt ook gebruikt om andere enzymen, zoals dehydrogenasen, die geen enkele fixatie verdragen, histochemisch te localiseren. Zij biedt door de snellere werkwijze, ook voordelen voor de histochemie van alkalische en zure fosfatase. De vriescoupes kunnen worden gemaakt op een normaal vriesmicrotoom, waarbij het mes met koolzuursneeuw wordt gekoeld. Deze methode wordt algemeen gebruikt als tijdens een operatie consult van de patholoog-anatoom wordt gevraagd. De nadelen van het gebruikelijke vriesmicrotoom zijn echter, dat het hiermee niet goed mogelijk is om coupes te maken, die steeds dezelfde dikte hebben, terwijl het maken van serie-coupes zeer moeilijk is. Linderstrøm-Lang en Mogensen (1938) beschreven een methode, waarbij het microtoom in een gekoelde kast (cryostaat) was opgesteld. Bij deze constante lage temperatuur is het mogelijk met een microtoom volgens Minot c.s. dunne seriecoupes te snijden van ongefixeerd weefsel. Coons c.s. (1951) vervolmaakten de cryostaat door de koelkast mechanisch te koelen. Ook gaven ze de kast een andere vorm. De cryostaat, zoals wij die gebruiken, werd op onze aanwijzingen vervaardigd door de firma Esta te Amersfoort en komt in principe overeen met het model van Coons (Willighagen, 1959).

Aan de voorzijde bevindt zich een uit vier glaslagen bestaande ruit, waardoor in de cryostaat gekeken kan worden. Tussen deze ruiten is lucht aanwezig, waardoor een goede isolatie verzekerd is. Onder dit venster is een luikje waardoor het weefsel, objectglazen en dergelijke naar binnen gebracht en de gemaakte coupes naar buiten gehaald kunnen worden. In de schuin toelopende zijwanden zijn armsgaten aangebracht, waarin handschoenen van lamsvel bevestigd zijn.

In de cryostaat staat een paraffine microtoom van het type Minot, dat gesmeerd wordt met Tellus-olie [1]). Op het microtoommes rust een wegklapbaar glasplaatje, dat door dunne stukjes celluloid op een afstand van plm. 50μ van het mes gehouden wordt. Dit instrument dient om het oprollen van de coupes bij het snijden tegen te gaan. Het is mogelijk om met behulp van deze apparatuur van vers weefsel seriecoupes te maken van 5 tot 10μ dikte en hierop een reeks kleuringen te doen.

De vriescoupes worden na ontdooien gefixeerd in aceton. Duidelijke verschillen in localisatie van de activiteit van alkalische of zure fosfatase ten opzichte van het paraffine materiaal hebben wij niet waargenomen.

---

[1]) Tellus olie 23 werd ons welwillend ter beschikking gesteld door Shell Nederland N.V. Deze olie bezit ook bij —40° C nog smerend vermogen.

SAMENVATTING EN SLOTBESCHOUWING

In dit proefschrift wordt verslag uitgebracht over het histochemisch onderzoek van de activiteit van alkalische en zure fosfatase. Het onderzochte materiaal was voor het grootste deel menselijk weefsel afkomstig van operatiepreparaten.

Doordat al het onderzochte materiaal op dezelfde wijze is bewerkt, zijn de waarnemingen in de verschillende weefsels met elkaar te vergelijken. Wil men de resultaten van andere onderzoekers met elkaar vergelijken, dan biedt dit juist vaak moeilijkheden omdat de gebruikte methoden bij het onderzoek van verschillende organen niet dezelfde zijn geweest.

Na een inleiding werd in het tweede hoofdstuk een overzicht gegeven van de literatuur over de histochemie van alkalische en zure fosfatase.

In hoofdstuk III zijn de localisatie en de activiteit van alkalische fosfatase in normaal en pathologisch veranderd menselijk weefsel beschreven. Wat betreft zure fosfatase werd een overzicht gegeven in hoofdstuk IV. De activiteit van alkalische en zure fosfatase in gezwellen werd afzonderlijk besproken in hoofdstuk V.

De door ons toegepaste methodiek werd in hoofdstuk VI uitvoerig beschreven.

Het eerste resultaat van dit histochemisch onderzoek is, dat we tot een overzicht zijn gekomen van de localisatie en de activiteit van de enzymen alkalische en zure fosfatase in normaal en pathologisch veranderd weefsel.

Door de localisatie van de enzymactiviteit in bepaalde cellen en bepaalde delen van cellen krijgen we aanwijzingen over de mogelijke betekenis van de enzymen in de celstofwisseling. De activiteit van alkalische fosfatase in de endotheelcellen van capillairen en in het apicale deel van epitheelcellen, die lumina begrenzen, schijnt er op te wijzen, dat dit enzym van belang is bij resorptie en uitscheiding. Hierbij is echter op te merken, dat niet in alle capillairen met de histochemische methode de activiteit van alkalische fosfatase is aan te tonen.

In de hartspier en in het pancreas bevatten bij de mens de endotheelcellen wel alkalische fosfatase, daarentegen is in de capillairen van de dwarsgestreepte spier en in de glomerulus van de nier geen enzymactiviteit aanwezig.

Een moeilijkheid bij de interpretatie van de enzymactiviteit is, dat bij verschillende diersoorten de enzymactiviteit niet dezelfde behoeft te zijn. Een zeer duidelijk voorbeeld van deze soort verschillen is de activiteit van alkalische fosfatase in rijpe polynucleaire leucocyten. Deze is aanwezig bij rat, cavia, konijn en mens, ontbreekt echter in de leucocyten van muis en hond. Dit is slechts een enkel voorbeeld van de verschillen, die te vinden zijn als men de organen van verschillende zoogdieren vergelijkt. Wij willen nu terugkomen op de in de inleiding vermelde mogelijkheden om de waargenomen activiteiten van beide onderzochte enzymen bij de pathologische diagnostiek te gebruiken.

De mogelijkheden, die overwogen werden, waren de volgende:

A. De enzymactiviteit verschaft inlichtingen over de functionele toestand van cellen.

B. De enzymactiviteit kan benut worden bij de identificatie van cellen.

C De enzymactiviteit geeft steun bij de differentiële diagnose van gezwellen.

Deze punten zou ik nu afzonderlijk willen toelichten.

Ad A: De grootste moeilijkheid bij het interpreteren van een daling van de activiteit van alkalische en zure fosfatase ligt daarin, dat de betekenis van deze enzymen in het celmetabolisme niet bekend is. Wij weten immers niet of een daling of verdwijnen van de activiteit van alkalische fosfatase uit de *tubuli van de nier* betekent, dat deze tubuli al hun functies of slechts een deel ervan verloren hebben. Indien door circulatiestoornissen of chronische ontsteking een nier beschadigd wordt, gaat de functie van de tubuli verloren. De activiteit van alkalische fosfatase verdwijnt dan eveneens. Dat, bij verdwijnen of dalen van de activiteit van alkalische fosfatase, alle functies van de tubuli verloren zijn gegaan, lijkt ons minder waarschijnlijk. Toch menen wij op grond van het feit, dat in pathologische omstandigheden de alkalische fosfatase verdwijnt, dat de vermindering van de enzymactiviteit als een maat genomen kan worden voor de graad van beschadiging van de tubuli contorti.

In bindweefsel zien we in een bepaalde fase van de collageenvorming sterke activiteit van alkalische fosfatase in de *fibroblasten*. Dit moment van sterkste enzymactiviteit ligt vlak voor de collagenisatie van bindweefsel. De alkalische fosfatase geeft ons dus voor fibroblasten een indruk over de functionele toestand van fibroblasten. Welke de functionele betekenis is van alkalische fosfatase in

de *endotheelcellen van de capillairen* is evenmin duidelijk. De waarneming, dat in verschillende organen een wisselend aantal capillairen alkalische fosfatase bevat, doet ons toch vermoeden, dat dit enzym van betekenis is voor transport van stoffen door de vaatwanden.

Opmerkelijk is de hoge activiteit van alkalische fosfatase in *leucocyten* in ontstekingsinfiltraten. Het was uit de literatuur bekend, dat de activiteit van dit enzym in leucocyten stijgt bij stress. Bovendien is de activiteit van alkalische fosfatase hoog in de polynucleaire leucocyten van patiënten met polycythaemie. Het tegengestelde is het geval bij patiënten met myeloide leucaemie. In de rijpe polynucleaire leucocyten is in deze gevallen geen activiteit van alkalische fosfatase aan te tonen.

In de *cellen van de bijnierschors* zien we, dat de cellen van de zona glomerulosa geen, de cellen van de zona fasciculata weinig, de cellen van de zona reticularis de meeste alkalische fosfatase bevatten. Wij nemen waar, dat bij patiënten met de ziekte van C u s h i n g groepen cellen in de zona fasciculata minder alkalische fosfatase bevatten dan bij normale mensen. Bovendien is de zône met sterkere activiteit van alkalische fosfatase verbreed. De regelmatige opbouw van de bijnierschors is bij de ziekte van C u s h i n g verstoord. Dit komt vooral tot uiting bij de bestudering van de activiteit van alkalische fosfatase in de bijnierschors. Welke de betekenis is van de alkalische fosfatase in de bijnierschors is onbekend, wel zien we echter een duidelijke verandering van het patroon van de activiteit van dit enzym bij verandering van activiteit van de bijnierschors.

De *galcapillairen* in de lever zijn voor een deel zichtbaar te maken met de histochemische methode voor alkalische fosfatase. Dit berust op aanwezigheid van alkalische fosfatase in de gal. Bij galstuwing nemen we waar, dat het aantal zichtbaar te maken galcapillairen toegenomen is. Terwijl bij sterke galstuwing deze galcapillairen niet meer als fijne takjes imponeren, maar tot dikke vertakte pijpjes met kleine uitpuilende knopjes geworden zijn. Met de methode voor alkalische fosfatase zijn we dus in staat om de mate van galstuwing te beoordelen.

Hoewel de betekenis van de alkalische fosfatase bij het proces van de *verbening* niet geheel duidelijk is, kan de activiteit van dit enzym in beenweefsel toch als een indicator voor het verbeningsproces worden gebruikt.

De cyclische verandering van de activiteit van alkalische- en zure fosfatase in het epitheel van de buisjes van het *endometrium* geeft ons eveneens de mogelijkheid verband te leggen tussen de enzymactiviteiten en de functionele toestand van het endometrium.

Bij het onderzoek van het menselijk weefsel is gebleken, dat in *cellen, die ge-*

stapeld hebben, de activiteit van zure fosfatase hoog is. Bij verder experimenteel onderzoek bleek, dat de activiteit van zure fosfatase stijgt in velerlei soort cellen nadat ze iets opgenomen hebben. De activiteit van zure fosfatase kan daarom in deze cellen beschouwd worden als kenmerk van de fagocytaire functie.

Wij menen, dat de hoge activiteit van zure fosfatase in de tubuli contorti van de nier een functioneel kenmerk is van het feit, dat in deze cellen van de tubuli contorti opneming heeft plaats gevonden van eiwitten.

Ad B. De activiteit van intracellulaire enzymen kan benut worden voor identificatie van cellen. Het is bijvoorbeeld goed mogelijk om uit te maken of cellen deel uit maken van het *histio reticulo-endotheliale systeem,* op grond van de hoge activiteit van zure fosfatase in deze cellen. Bovendien is het vaak gemakkelijker om deze cellen met behulp van een histochemische methode op te sporen, omdat bij microscopisch onderzoek reeds met zwakke vergroting deze cellen door het in de cellen gevormde neerslag zijn te onderkennen. Men kan op deze wijze met de methode voor zure fosfatase, macrofagen, histiocyten en reuzencellen snel in coupes opsporen. De ganglioncellen van de plexus van M e i s s n e r en A u e r b a c h neemt men op deze wijze eveneens gemakkelijk waar. Het ontbreken van deze cellen bij de *ziekte van H i r s c h s p r u n g* kan men op grond van het ontbreken van de activiteit van zure fosfatase snel diagnosticeren.

Met de methode voor alkalische fosfatase neemt men reeds met zwakke vergroting de *polynucleaire leucocyten* in ontstekingsinfiltraten waar.

Ad C. Aan de mogelijkheid om gezwellen op grond van hun enzymactiviteit te onderscheiden is hoofdstuk V gewijd. Het is mogelijk gebleken de gezwellen van de mens in groepen in te delen op grond van de activiteit van alkalische en zure fosfatase in de tumorcellen. Door de activiteit van deze fosfatasen te onderzoeken in gezwelweefsel waarvan de oorsprong niet bekend is, verkrijgt men nieuwe gegevens, die gebruikt kunnen worden bij de differentiële diagnose. Een enkele maal is de activiteit van een enkel enzym voldoende om de diagnose te helpen stellen.

Indien in gezwelweefsel, waarvan de oorsprong niet bekend is, de activiteit van zure fosfatase zeer hoog is dan betreft het zeker een metastase van een prostaatcarcinoom. Het is mogelijk om met grote waarschijnlijkheid een adenocarcinoom van de long te onderscheiden van een adenocarcinoom van de tractus digestivus op grond van de hoge activiteit van alkalische fosfatase in het adenocarcinoom van de long. Wij menen, dat het mogelijk is reticulumcelsarcoom,

lymfosarcoom en anaplastisch carcinoom van elkaar te onderscheiden op grond van de typische verdeling van de cellen met activiteit van zure fosfatase in coupes van deze gezwelsoorten.

Van groot belang hierbij is, dat wij in ons gezwelmateriaal geen verschillen gevonden hebben tussen de oorspronkelijke tumor en metastasen wat betreft de activiteit van beide onderzochte enzymen.

Welke zijn nu de mogelijkheden om dit onderzoek voort te zetten? In de eerste plaats zijn er bij dit onderzoek waarnemingen gedaan, die uitvoeriger geanaliseerd zouden kunnen worden. Als voorbeeld kan hier de wisselende activiteit van alkalische fosfatase tegen het epitheel van de galblaas vermeld worden. De vraag is daarbij of er verband bestaat tussen de activiteit van alkalische fosfatase tegen het epitheel en de mobiliteit van de galblaas. Een verdere uitbreiding van het onderzoek kan gevonden worden in de uitbreiding van het aantal histochemische enzymmethoden, die men toepast op normaal en pathologisch veranderd materiaal.

Daar bij het onderzoek met slechts twee histochemische enzymmethoden reeds talrijke waarnemingen werden gedaan, die toegepast konden worden bij het pathologisch-anatomisch onderzoek, hebben wij deze voortzetting gekozen [1]). Hierbij is gebleken, dat voor de in de inleiding genoemde punten, A celfunctie, B celtypering en C differentiële diagnose van gezwellen talrijke nieuwe waarnemingen gedaan konden worden. Vooral voor het laatste punt, de differentiële diagnose van gezwellen, biedt het onderzoek van de activiteit van meerdere enzymen mogelijkheden.

Het is mogelijk een aantal gezwellen op grond van een typisch enzympatroon te karakteriseren. De enzympatronen zijn te gebruiken voor de differentiële diagnostiek van metastasen van deze tumoren (Willighagen en Planteydt 1959; Willighagen 1960).

Het histochemisch onderzoek maakt het mogelijk steeds meer weefselbestanddelen kwalitatief en zelfs grof kwantitatief aan te tonen. Een andere mogelijke voortzetting van dit onderzoek is te trachten, de hoeveelheid van de aange-

---

[1]) Met histochemische methoden voor 5-nucleotidase, adenosine-tri-fosfatase, niet specifieke esterasen, aminopeptidase, glucose-6-fosfatase, cytochroom-oxidase, barnsteenzuurdehydrogenase, D.P.N.-diaforase, T.P.N.-diaforase, melkzuurdehydrogenase, boterzuurdehydrogenase, appelzuurdehydrogenase, alcoholdehydrogenase, glycerofosfaatdehydrogenase, isocitroenzuurhydrogenase, glutaminezuurdehydrogenase, glucose-6-fosfaatdehydrogenase en fosfogluconaatdehydrogenase.

toonde weefselbestanddelen nauwkeuriger kwantitatief te meten. Ook op dit gebied is een belangrijke ontwikkeling aan de gang: de microspectrofotometrie, de interferentiemicroscopie en ultra-microchemische bepalingen maken het mogelijk om uiterst geringe hoeveelheden van bepaalde stoffen in celgroepjes, enkele cellen en soms zelfs in celbestanddelen, zoals celkernen, te meten. Deze kwantitatieve methodieken zijn echter nog weinig toegepast op pathologisch veranderd weefsel. Wij menen, dat toepassing van kwantitatieve methoden op normaal en pathologisch veranderd weefsel wijde perspectieven biedt.

Het blijkt dus mogelijk het histochemisch onderzoek van menselijk weefsel zowel in de breedte — toepassen van een groot aantal kwalitatieve methoden — als in de diepte — toepassen van kwantitatieve methoden — uit te breiden en voort te zetten. Hierdoor zal de betekenis van het toegepast histochemisch onderzoek in de pathologie toenemen.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

A report is given on the histochemical investigation of the activity of alkaline and acid phosphatase. Most of the tissues that have been studied are human biopsy specimens obtained directly from the surgical rooms. The histochemical enzyme reactions were always performed in the same way, therefore the observations in different tissues are comparable. As several investigators used different methods, a comparison of their observations is difficult.

After an introduction in chapter II a review of the literature available about the histochemistry of alkaline and acid phosphatase is given. In chapter III a description of the localization and the activity of alkaline phosphatase in normal and pathologically changed human tissues is given. The same is done for acid phosphatase in chapter IV. A description of the activity of alkaline and acid phosphatase in tumours is separately given in chapter V.

The methods we used are described extensively in chapter VI.

A first result of this investigation is that we now have a general view on the localization and the activity of alkaline and acid phosphatase in normal and pathologically changed human tissues.

The localization of the enzyme activity in distinct cells and distinct parts of cells indicates the possible significance of these enzymes in the cell metabolism. The activity of alkaline phosphatase in the endothelial cells of the capillairies and in the lining of epithelial cells seems to indicate that this enzyme is of importance in resorption and excretion. However it is not possible to demonstrate activity of alkaline phosphatase in all capillairies.

In the human heartmuscle and in the human pancreatic gland all the endothelial cells of the capillairies contain alkaline phosphatase. On the other hand there is no activity of alkaline phosphatase in the capillairies of the striated muscles and the glomeruli of the kidney.

It is difficult to understand why the activity of enzymes is different in the same organs of different animal species. An example of these differences is the activity of alkaline phosphatase in mature polynuclear leucocytes. In the leucocytes of rats, guinea pigs, rabbits and men there is activity of alkaline phospha-

tase, where there is no activity of this enzyme in the leucocytes of mice and dogs.

In chapter I we outlined the possibilities to use the differences in enzyme activities for pathological diagnosis.

The possibilities suggested were:

A. The activity of an enzyme gives information on the function of cells.

B. The activity of an enzyme can be used for identification of cells.

C. The activity of an enzyme can be a help in the differential diagnosis of tumours.

We should like to explain these points more extensively.

Ad A. It is difficult to give an interpretation of decrease or increase of the activity of alkaline and acid phosphatase because the significance of these enzymes in cell metabolism is not known. We do not know if the decrease or the disappearance of the activity of alkaline phosphatase from the tubules of the kidney means, that the tubuli lost all their functions or only some of their functions. In cases of vascular occlusion or chronic inflammation of the kidney the tubuli contorti lose part of their functions. Thus the activity of alkaline phosphatase decreases or disappears under these conditions. It seems to us that not all the functions of the tubuli are lost, but we think that the decrease of the activity of alkaline phosphatase can be used as a measure for the damage of the renal tubules.

In connective tissue during a certain phase of collagen formation a strong activity of alkaline phosphatase can be seen in the fibroblasts. The activity of alkaline phosphatase in fibroblasts gives us also an impression of the functional state of the fibroblasts.

The meaning of the activity of alkaline phosphatase in the endothelial cells of capillairies is not clear. The observation that in different organs there is activity of alkaline phosphatase in a variable number of endothelial cells gives us the idea, that this enzyme is of some importance for transporting substances through vessel walls.

In the adrenal cortex there is no activity of alkaline phosphatase in the cells of the zona glomerulosa. There is a gradually increasing activity of this enzyme in the cells of the zona fasciculata which increases more towards the zona reticularis. In the zona reticularis the activity of alkaline phosphatase is the highest. We observed that in the adrenal cortex of patients with C u s h i n g's disease there is an irregular pattern of the activity of alkaline phosphatase in the cells of the zona fasculata. The pattern of gradually increasing activity of alkaline

phosphatase towards the zona reticularis is disturbed. We do not know the significance of the activity of alkaline phosphatase in the adrenal cortex, but we can observe a change of activity of this enzyme when there is a change of activity of the adrenal cortex.

It is easily possible to demonstrate bile caniculi in the liver by using the histochemical method for alkaline phosphatase, because there is alkaline phosphatase in the bile. When there is an obstruction of the bile ducts the number of bile caniculi that can be made visible by this technique is increased. When there is a severe obstruction a dilation of the bile caniculi can also be seen. With the histochemical method for alkaline phosphatase we are able therefore to judge the degree of bile stasis.

Although the significance of alkaline phosphatase in bone formation is not clear, the activity of this enzyme can be used as an indicator for bone formation.

There is also the possibility to connect enzyme activities and functional state in observing the cyclic changes of alkaline and acid phosphatase activities in the cyclus of the endometrium.

During the investigation of human tissues it appeared that in macrophages and other cells that stored some substances, there is a high activity of acid phosphatase. In further experimental investigations it appeared also that in many cells there is an increase of acid phosphatase activity after storage of various substances.

Thus the activity of acid phosphatase can be used as a criterion for the phagocytotic function.

We think that the high activity of acid phosphatase in the tubuli contorti of the kidney in various pathological conditions indicates that in the cells of these renal tubules there was an increased intake of protein.

Ad B. The activity of intracellular enzymes can be used to identify cells. As an example it is easy to find cells of the histo-reticulo-endothelial system because of the high activity of acid phosphatase in these cells.

Therefore it is often easier to detect these cells with a histochemical method. On microscopical examination with low power magnification these cells can be recognised because of the precipitates that are formed in these cells by the enzyme reaction. It is easy in such a manner to detect with the acid phosphatase method, macrophages, histiocytes and giant cells.

The ganglion cells of the plexus of Auerbach and Meissner are also easily observed in this way. With the acid phosphatase method no ganglion cells can be seen in cases of Hirsprung's disease so it can be quickly diagnosed.

Polynuclear leucocytes in inflammatory infiltrates can be readily detected with the method for alkaline phosphatase.

Ad C. The possibilities to differentiate tumours on the basis of their enzyme activities are discussed in chapter V. It appears possible to group human tumours on the basis of the activity of alkaline and acid phosphatase in the tumour cells. By investigating the activity of these phosphatases in tumour specimens of unknown origin, one can obtain new facts, that can be used in differential diagnosis.

In a few cases only can the activity of one enzyme be sufficient to make the diagnosis. As an example when there is a high activity of acid phosphatase in a tumour metastasis, probably it must be a metastasis of a prostatic carcinoma.

It seems possible to differentiate a primary adenocarcinoma of the lung from an adenocarcinoma of the intestinal tract because of the high alkaline phosphatase activity in adenocarcinomas of the lung. We think it possible to differentiate reticulum cell sarcoma from lymphosarcoma and anaplastic carcinoma because of typical patterns wich the cells with a high activity of acid phosphatase have in the sections of these tumour types.

It is of great importance that during our investigation no differences were observed between the activity of acid and alkaline phosphatase in the primary tumours and their metastasis.

What are the possibilities to continue this investigation? First there are many observations that could be analysed more extensively. An example is the difference in the activity of alkaline phosphatase in the epithelial cells of various bile bladders. The question arises whether or not there is a relation between the activity of alkaline phosphatase on the surface of these epithelial cells and the mobility of the bile bladder.

There could be a further extension of this investigation by applying more histochemical enzyme methods other than alkaline and acid phosphatase on normal and pathologically changed tissues. We have chosen this manner of investigation [1]).

It appears from the possibilities outlined in the introduction A: cell function,

---

[1]) With methods for 5-nucleotidase, adenosine-tri-phosphatase, non-specific esterases, amino-peptidase, glucose-6-phosphatase, cytochromoxidase, succinic-dehydrogenase, DPN-diaphorase, TPN-diaphorase, lactic-dehydrogenase, butyric-dehydrogenase, malic-dehydrogenase, alcohol-dehydrogenase, glycerophosphate-dehydrogenase, isocitric-dehydrogenase, glutamine-dehydrogenase, glucose-6-phosphate-dehydrogenase and phospho-gluconate-dehydrogenase.

B: cell characterisation and C: differential diagnosis of neoplasms, that numerous new correlations could be found. Especially for the differential diagnosis of tumours the investigation of enzyme activities offers new possibilities.

It is possible to characterize a number of tumours on the basis of a typical enzyme pattern. These enzyme patterns can be used for differential diagnosis, Willighagen en Planteydt 1959, Willighagen 1960.

Histochemical investigations open the possibility to demonstrate more and more tissue elements qualitatively and even to some extend quantitatively. A third possibility to extend this investigation is to try to estimate more accurately the amount of the substances in tissue sections. In this field an important development is on its way. With microspectrophotometrical, interference microscopical and ultramicrochemical estimations there are possibilities to measure small amounts of several substances in cellgroups, big cells and even in parts of cells like nuclei. These quantitative methods are applied only in a few pathological conditions and therefore we think that there are possibilities in using these microquantitative methods.

Thus there are some possibilities to extend the application of histochemical methods on human tissues: application of more qualitative methods or application of microquantitative methods.

We think that by using these methods the importance of applied histochemistry in pathological investigation will grow.

LITERATUUR

ABOLINS, L., Alkaline phosphatase in various cell types of the anterior pituitary of the guinea pig. 1948 Nature *161:* 556-557.

ABOLINS, L., A. ABOLINS, Different kind of acid phosphatase in various cytological structures of anterior pituitary of the guinea pig. 1949 Nature *164:* 455-456.

ALLEGRA, G., R. NUITTA, G. PASTORE, Studi bio-istochimico sulle fosfatasi renali in cani florizinati, dopo carico di vitamine ed ormoni. 1954 Arch. „De Vecchi" Firenze *22:* 281-295.

D'ANCONA, S., La fosfatasi alcaline in alcuni tumori endocranica. 1954 Riv. Anat. patol. *9:* 387-402.

ARNOLD, W., Über die histochemisch darstellbare Gewebsphosphatase. 1949 Zentrallbl. für Allg. Path. u. Path. Anatomie *85:* 102-103.

ARNOLD, W., ST. OECH, Histochemische Phosphatase Untersuchungen bei malignen Tumoren. 1950 Z. Krebsforsch. *56:* 543-555.

ARZAC, J. P., E. BLANCHET, Alkaline phosphatase and glycogen in human endometrium. 1948 J. Clin. Endocr. *8:* 315-324.

ATKINSON, W. B., E. T. ENGLE, Studies on endometrial alkaline phosphatase during the human menstrual cycle and in the hormone-treated monkey. 1947 Endocrinology *40:* 327-333.

ATKINSON, W. B., H. ELFTMAN, Mobilization of alkaline phophatase in the uterus of the mouse by estrogen. 1947 Endocrinology *40:* 30-36.

ATKINSON, W. B., S. B. GUSBERG, Histochemical studies on abnormal growth of human endometrium. 1948 Cancer *1:* 248-251.

AYRE, W. B., Alkaline phosphatase in benign and malignant cells in the vaginal smear. 1951 Cancer *4:* 159-167.

BALDWIN, E., Dynamic aspects of biochemistry. 3e druk. 1957 University Press Cambridge.

BARKA, T., S. SZALAY, Z. POSALAKY, L. KERTESZ, Quantitative histochemical determination of phosphatase by means of radio active lead. 1952 Acta Anat. *16:* 45-53.

BARRNETT, R. J., A. M. SELIGMAN, Histochemical demonstration of esterases by production of indigo. 1951 Science *114:* 579-582.

BARRNETT, R. J., The distribution of esterolytic activity in the tissues of the rat as demonstrated with indoxylacetate. 1952 Anat. Rec. *114:* 577-600.

BARRNETT, R. J., G. E. PALADE, Histochemical demonstration of the sites of activity of dehydrogenase systems with the electron microscope. 1957 J. Bioph. & Bioch. Cyt. *3:* 577-588.

BARTON, R., Diffusion of alkaline phosphatase to characteristic intra cytoplasmic sites of activity. 1954 Nature *173:* 1233-1234.

BECK, W. S., W. W. VALENTINE, Phosphatase activity in chronic lymphatic leucemia, acute leucemia and miscellanous hematologic conditions. 1951 J. of Lab. & Clin. Med. *38:* 245-253.

BENNETT, H. S., A suggestion as to the nature of the lysosome granules. 1956 J. Biophysic. and Biochem. Cytol. *2* suppl. 185.

BERENBOM, M., H. O. JOKOYAMA, R. E. STOWELL, Chemical and enzymatic changes in the following freezing-drying and acetone fixation. 1952 Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. *81:* 125-128.

BERG, M., S. A. LEVINSON, K. J. WANG, Effect of experimental shock induced by clostridium perfringens toxin on the kidney of dogs. 1951 Arch. Path. *51:* 137-153.

BERG, M., S. A. LEVINSON, Alkaline phosphatase activity of the kidney, following experimental shock in dogs induced by clostridium perfringens toxin. 1952 Arch. Path. *53:* 79-86.

BERG, M., S. A. LEVINSON, Nephrotoxic damage by clostridium perfringens. 1955 Arch. Path. *59:* 656.

BERN, H. A., The distribution of alkaline phosphatase in the genital tract of male mammals. 1949 Anat. Rec. *104:* 361-378.

BOIVIN, P., R. ROBINAUX, Histochimie des cellules sanguines. II Phosphatase alcaline. 1956 Le Sang *27:* 535-545.

BOURNE, G., The distribution of alkaline phosphatase in various tissues. 1943 Quart. J. Exper. Physiol. *32:* 1.

BOURNE, G. H., Phosphatase and bone. Chapter IX. Biochemistry and physiology of bone. 1956 Academic Press Inc. New York.

BRANDES, D., R. N. ELSTON, An electron microscopical study of the histochemical localization of alkaline phosphatase in the cell wall of Chlorella vulgaris. 1956 Nature *177:* 274.

BURT, R. C., B. R. MEREDITH, R. C. CRAUER, Histochemical study of a fluoride resistant acid phosphatase reaction in the mouse duodenum. 1957 J. Histoch. & Cytoch. *5:* 135-139.

BURTON, J. F., The histological demonstration of alkaline phosphatase activity in human endometrium. 1953 Brit. J. Exper. Path. *34:* 159-163.

CAMMERMEYER, J., The histochemistry of the mammalian area postrema. 1949 J. Comp. Neurol. *90:* 121-151.

CARGILL, W. H., H. D. BRUNNER, Metabolism of C^{14} labeled dextran in the mouse. 1951 J. Pharmacol. & Exper. Therap. *103:* 339.

CHIQUOINE, A. D., Distribution of alkaline phosphomonoesterase in the central nervous system of the mouse embryo. 1954 J. Comp. Neurol. *100:* 415.

CLELAND, K. W., A study of the alkaline phosphatase reaction in tissue sections. II The histological and cytological validity. 1950 Proc. Linnaen. Soc. N.S.W. *75:* 54.

COHN, S. H., J. W. GONG, Effect of 2000 roentgens local X-irradiation on metabolism and alkaline phosphatase activity of rat bone. 1953 Amer. J. Physiol. *173:* 115-119.

COONS, A. H., M. H. KAPLAN, E. H. LEDUC, Localization of antigen in tissue cells. VI The fate of injected foreign proteins in the mouse. 1951 J. Exp. Med. *93:* 173-180.

DANIELLI, J. F., The enzymes in healing wounds. II The effect of different degrees of vitamin-C deficiency on the phosphatase activity in experimental wounds of the guinea pig. 1945 Brit. J. Exper. Path. *26:* 367-376.

DANIELLI, J. F., A critical study of techniques for determining the cytological position of alkaline phosphatase. 1946 J. Exper. Biol. *22:* 110-117.

DANIELLI, J. F., Cytological demonstration of alkaline phosphatase. 1950 Nature *165:* 762.

DAVIES, H. J., M. H. F. WILKINS, J. CHAYEN, L. F. LA COUZ, The use of the interference microscope to determine dry mass in living cells and as a quantitative cytochemical method. 1954 Quart. J. Microsc. Sci. *95:* 271-304.

DAVIES, H. J., B. ENGFELDT, Distribution of dry mass in malignant epithelial tumours. 1954 Lab. Invest. *3:* 277-284.

DAVIES, J., Correlated anatomical and histochemical studies on the mesonephros and placenta of the sheep. 1952 Am. J. Anat. *91:* 263-300.

DEMPSEY, E. W., G. B. WISLOCKI, Further observations on the distribution of phosphatases in mammalian placentas. 1947 Am. J. Anat. *80:* 1-33.

DEMPSEY, E. W., H. BUNTING, J. B. WISLOCKI, Observations on the chemical cytology of the mammary gland. 1947 Am. J. Anat. *81:* 309-342.

DOWNEY, M., B. HICKEY, M. E. SHARP, The acid phosphatase content of the enlarged and malignant prostate gland with some observations on histopathology as revealed by Gomori's staining. 1954 Brit. J. Urol. *26:* 160-165.

DOYLE, W. L., Quantitative aspects of the histochemistry of phosphatases. 1951 Symposion on cytology East Lansing Michigan State College Press.

DOYLE, W. L., J. H. OMOTO, M. E. DOYLE, Estimation of phosphatase in histological preparation. 1951 Exp. Cell. Res. *2:* 20-38.

DRENNAN, J. M., Alkaline phosphatase in breast carcinomas. 1952 Brit. J. Surg. *39:* 458-461.

DE DUVE, C., H. BEAUFAY, L. DECKERS-PARSEAU, J. MAIZIN, Lysosomes and liver pathology. I Experimental basis of the lysosome concept. 1956 J. Biol. Chem.

DUIJN, P. VAN, R. G. J. WILLIGHAGEN, A. E. F. H. MEIJER, Increase of acid phosphatase activity in mouse liver after dextran storage. 1959 Bioch. Pharmacol. *2:* 177-181.

DUIJN, P. VAN, A histochemical specific thione-SO_2 reagent and its use in a bi-color method for desoxyribonucleic acid and periodic acid Schiff positive substances. 1956 J. Histoch. and Cytoch. *4:* 55-63.

EICHNER, D., Zur Frage der Ferment lokalisation in der Netzhaut des Menschen. 1956 Zeitschr. f. Zellforsch. *44:* 339-344.

ENGSTRAND, L., B. ÅBERG, Excretion of intravenously administered dextran. 1950 Lancet I 1071-1073.

ERÄNKÖ, O., M. NIEMI, Histochemically demonstrable phosphatases in the kidney of hydronephrotic rats. 1954 Acta Path. & Microb. Sc. *35:* 357-364.

ERÄNKÖ, O., Z. ZEHTO, Distribution of acid and alkaline phosphatases in human metanephros. 1954 Acta Anat. *22:* 277-288.

FEIGIN, I., A. WOLF, E. A. KABAT, A difficulty in the histochemical localization of alkaline phosphatase in nuclei. 1950 Am. J. Path. *26:* 647-659.

FEIGIN, I., A. WOLF, Nuclear staining in the Gomori method for alkaline phosphatase. 1953 J. Hist. & Cytoch. *I:* 250.

FEIGIN, I., A. WOLF, Artifactual nuclear staining in the Gomori method for demonstrating alkaline phosphatase. 1953 Lab. Investigation *2:* 115.

FEIGIN, I., The effect of magnesium on nuclear staining in the Gomori method for localizing alkaline phosphatase activity. 1954 J. Cyt. & Histochem. *2:* 435.

FEIGIN, I., A. WOLF, The phosphatase of the nervous system. 1955 J. Neuropath. *14:* 11-22.

FELL, H. B., DANIELLI, J. F., The enzymes of healing wounds. I The distribution of alkaline phosphomonoesterase in experimental wounds and burns in the rat. 1943 Brit. J. Exper. Path. *24:* 196-203.

FISHMAN, W. H., F. A. LERNER, A method for estimating serum acid phosphatase of prostatic origin. 1953 J. Biol. Chem. *200:* 89-97.

FONNESU, A., C. SEVERI, Comportamento della fosfatasi alcaline nel rene in rigonfiamento morbido. 1952 Riv. Biol. *44:* 381-389.

FORAKER, A. G., A histochemical study of breast carcinoma. 1956 Surgery, Gynecol. a. Obstetrics 102; 1-8.

FORAKER, A. G., Histochemical studies in squamous carcinoma. 1956 Cancer *9:* 367-373.

FRASER, D., E. R. JENDT, F. H. R. CHRISTIE, Metabolic abnormalities in hypophosphatasia. 1955 Lancet vol.: *286.*

FREDERICSSON, B., Alkaline phosphatase in the Golgi substance of intestinal epithelium. 1956 Exp. Cell. Res. *10:* 63-65.

FREIMAN, D. J., Use of an organic chelating agent in histochemical study of alcaline phosphatase activation. 1953 Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. *84:* 338-341.

FREIMAN, D. J., Organic chelating agent in the demineralization of bone for histochemical study of alkaline phosphatase. 1954 J. Clin. Path. *24:* 227-231.

FRENCH, J. E., E. D. BENDITT, Observations on the localization of alkaline phosphatase in healing wounds. 1954 Arch. Path. *57:* 352-356.

FRIEDE, R. Über Glykogen und alkalische Phosphatase in Hirntumoren und ihre biologische Bedeutung. 1956 Virch. Arch. *328:* 469-480.

FRUTON, J. S., S. SIMMONDS, General Biochemistry. 1953 Chapman & Hall. London.

GEDIGK, P., G. STRAUSS, Zur formalen Genese der Eisenpigmente. 1954 Virch. Arch. *326:* 172-190.

GEDIGK, P., Zür Histochemie des Zentralapparates der Zelle. 1954 Virch. Arch. *325:* 366-378.

GEDIGK, P., E. BONTKE, Über den Nachweiss von hydrolytischen Enzymen in Lypopigmenten. 1956 Ztschr. f. Zellforsch. *44:* 495-518.

GEDIGK, P., W. PIOCH, Über die Speicherung von Schwermetallverbindungen in mesenchymalen Geweben. 1956 Beitr. path. Anat. *116:* 124-148.

GEDIGK, P., W. PIOCH, Über die Bildung von organischen Substanzen in Siliciumdioxydgranulomen. 1956 Virch. Arch. *328:* 513-535.

GEDIGK, P., Zur Histochemie der Fremdkörperreaktionen. 1956 Verh. Dtsch. Gesell. f. Path. *59:* 206-211.

GELLER, H. F., Phosphatasegehalt der Prostata und ihrer epithelialen Geschwülste. 1954 Virch. Arch. *324:* 555-562.

GENESI, M., Histotopochemische Bemerkungen zur Verteilung der alkalischen Phosphatase. Enzymatische Aktivität der Ovaria, der Uterus und der menschlichen parovarialen Anhangsgebilde unter normale und pathologische Bedingungen. 1953 Minerva ginecol. *5:* 302-313.

GLÜCK, E., Les phosphomonoestérases des néoformations mammaires. Etudes histochimiques. 1952. Acta path. scand. Suppl. *93:* S. 106-120.

GOESSNER, W., Histochemischer Nachweiss hydrolytischer Enzyme mit Hilfe der Azofarbstoffmethode. 1958 Histochemie *1:* 48-96.

GOESSNER, W., Zur Enzymhistochemie der Langerhans'schen Inseln. 1959 Verh. Deutsch. Gesellsch. f. Path. *42:* 125-130.

GOETSCH, J. B., P. M. REYNOLDS, Obtaining uniform results in the histochemical technic for acid phosphatase. 1952. Stain Techn. *26:* 145-151.

GOETSCH, J. B., P. M. REYNOLDS, H. BUNTING, Modification of Gomori Method for Alkaline and Acid Phosphatase avoiding artefact staining of nucleus. 1952 Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. *80:* 71-75.

GOLDBERG, B., H. W. JONES, Acid phosphatase of the endometrium. Histochemical demonstrations in various normal and pathologic conditions. 1956 Obstetr. & Gyn. *7:* 542-546.

GOMORI, G., Microtechnical demonstration of phosphatase in ttissue sections. 1939 Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. *42:* 23.

GOMORI, G., Microscopic Histochemistry. Principles and Practice. 1952 The University of Chicago Press, Chicago.

GOMORI, G., The distribution of phosphatase in normal organs and tissues. 1941 J. Cell. Comp. Physiol. *17:* 71-83.

GOMORI, G., Distribution of acid phosphatase in tissues under normal and under pathological conditions. 1941 Arch. Path. *32:* 189-199.

GOMORI, G., Alkaline phosphataśe of cell nuclei. 1951 J. Lab. & Clin. Med. *37:* 526-531.

GOMORI, G., The complex nature of alkaline phosphatase. 1952 Biochim. et biophys. Acta *8:* 162-172.

GOMORI, G., Histochemical studies of the gastro-intestinal mucosa. 1953 J. Nat. Cancer Inst. *13:* 1039-1046.

GOULD, B. S., N. I. GOLD, Studies on the alkaline phosphatase associated with regenerating connective tissue fibers. 1951 Arch. Path. *52:* 413-422.

GRAEFF, J. DE, P. DE BAAN, Bilateral renal cortical necrosis. 1959 Act. Med. Scand. *163:* 341-348.

GREEP, R. O., C. J. FISHER, A. MORSE, Histochemical demonstration of alkaline phosphatase in decalcified dental and osseous tissues. 1947 Science *105:* 666.

GROGG, E., A. E. G. PEARSE, A critical study of the histochemical techniques for acid phosphatase with description of an azo-dye method. 1952. J. Path. & Bact. *64:* 627-636.

GROGG, E., A. G. E. PEARSE, Coupling azo-dye methods for histochemical demonstration of alkaline phosphatase. 1952 Nature *170:* 578-579.

HAAM, E. VON, D. J. SCARPELLI, Experimental carcinoma of the cervix. A comparative cytologic and histologic study. 1955 Cancer Res. *15:* 449-455.

HEPLER, O. E., H. GURLEY, J. P. SIMMONDS, Experimental nephropathies. II Renal phosphatase after poisoning with mercury bichloride, uranyl nitrate and potassium dichromate. 1945 Arch. Path. *39:* 133-141.

HIRSCH, G. C., Allgemeine Stofwechselmorphologie des Cytoplasmas. Handbuch der Allgemeinen Pathologie. Bnd II/erster Teil blz. 92 t/m 183. Springer Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg.

HOLT, S. J., A new principle for the histochemical localization of hydrolytic enzymes. 1952 Naure: 271-273.

HOLT, S. J., A new approach to the cytochemical localisation of enzymes. 1954 Proc. Royal Soc. B *142:* 160-169.

HOLT, S. J., The value of fundamental studies of staining reactions in enzymes histochemistry, with reference to indoxyl methods for esterases. 1956 J. of Histo- a. Cytochem. *4:* 541-555.

HOU, P. C., A. J. S. MCFATZEAU, Glycogen in primary carcinoma of the liver. 1956 J. Path. a. Bact. *72:* 411-414.

JASZMANN, L. J., Studie van de phosphatasen in het baarmoederslijmvlies van de mens. Proefschrift Leiden 1958.

JOHANSEN, G., K. LINDERSTRÖM-LANG, Liberation, diffusion and precipitation of phosphate in Gomori test. 1952 Acta Med. Scand. *142* Suppl. *266:* 601-613.

JONES, H. W. Jr., R. WADE, B. GOLDBERG, Biochemical and histochemical alkaline glycerophosphatase in normal endometrium, endometrial hyperplasia and adenocarcinoma. 1952 Amer. J. Obstetr. *64:* 1364-1367.

KABAT, E. A., J. FURTH, Histochemical study of the distribution of alkaline phosphatase in various normal and neoplastic tissues. 1941 Am. J. Path. *17:* 303-318.

KAPLOW, L. S., A histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity in smears of blood and marrow. 1955 Blood *10:* 1023-1029.

KRITZLER, R. A., A. B. GUTMAN, Alkaline phosphatase activity of the proximal convoluted tubules and the mechanism of phlorizin glycuresis. 1941 Am. J. Phys. *134:* 94-101.

KROON, D. B., Phosphatase and the formation of protein-carbohydrate complexes. 1952 Acta Anat. *15:* 317.

LANDOW, H., E. A. KABAT, W. NEWMAN, Distribution of alkaline phosphatase in normal and in neoplastic tissues of the nervous system. 1942 Arch. Neurol. & Psychiatr. *48:* 518-530.

LANG, W. R., A. E. RAHOFF, M. GROS, Alkaline phosphatase in vaginal biopsies. 1954 Amer. J. Obstetr. *68:* 815-818.

LANMAN, J. T., Hypophosphatasia - a newly recognized disease. 1955 J. of Ped. *47:* 509-513.

LA VELLE, A., L. CHANNAO, F. W. LA VELLE, Acid phosphatase activity as related to nucleic acid sites in the nerve cell. 1954 Anat. Rec. *119:* 305-324.

LEDUC, E. H., E. W. DEMPSEY, Activation and diffusion as factors influencing the reliability of the histochemical method for alkaline phosphatase. 1951 J. Anat. (Lond.) *85:* 305-315.

LILLIE, R. D., Histopathologic technic and practical histochemistry. 2e dr. 1954 The Blakiston Company Inc. New York-Toronto.

LINDERSTRÖM-LANG, K., K. R. MOGENSEN, Studies on enzymatic histochemistry. XXXI: Histological control of histochemical investigatitons. 1938 Compt. Rendu du Carlberg Lab. Sér. Chim. *23:* 27-35.

LORCH, I. J., Demonstration of phosphatase in decalcified bone. 1946 Nature *158:* 268.

LORCH, I. J., Localization of alkaline phosphatase in mammalian bones. 1947 Quart. J. Micr. Sc. *88:* 367-381.

MAN, J. C. H. DE, W. TH. DAEMS, R. G. J. WILLIGHAGEN, Electron dense bodies in liver tissue of the mouse in connection with the activity of acid phosphatase. 1960 Ultrastructure, ter perse.

MANHEIMER, L. H., A. M. SELIGMAN, Improvement in the method for the histochemical demonstration of alkaline phosphatase and its use in a study of normal and neoplastic tissue. 1948 J. Nat. Canc. Inst. *9:* 181-199.

MARSH, J. B., D. L. DRABKIN, Kidney phosphatase in alimentary hyperglycemia and phlorhizin glycosuria. A dynamic mechanism for renal threshold for glucose. 1947 J. Biol. Chem. *168:* 61-73.

MAZIA, D., P. A. BREWER, M. ALFERT, The cytochemical staining and measurement of protein with mercuric bromphenol blue. 1953 The Biol. Bull. *104:* 57-67.

McCANCE, R. A., A. B. MORRISON, C. E. DENT, The excretion of phosphoethanolamine and hypophosphatasia. 1955 Lancet: *131.*

McMANUS, J. F. A., R. W. MOWRY, The distribution of alkaline phosphatase in some abnormal human kidneys. 1948 Bull. Int. Assoc. Med. Mus. *28:* 80-95.

MENTEN, M. L., J. JUNGE, M. H. GREEN, A coupling histochemical azodye test for alkaline phosphatase in the kidney. 1944 J. Biol. Chem. *153:* 471-477.

MOOG, F., E. L. WENGER, The occurences of a neutral mucopolysaccharide at sites of high alkaline phosphatase activity. 1952 Amer. J. Anat. *90:* 339-377.

MOWRY, R. W., R. C. MILLICAN, A histochemical study of the distribution and fate of dextran in tissues of the mouse. Amer. J. Path. *29:* 523-545.

NACHLAS, M. M., W. PRINN, A. M. SELIGMAN, Quantitative estimation of lyo- and desmo-enzymes in tissue sections with and without fixation. 1956 J. Biophysic. Biochem. Cytol. *1:* 59-68.

NEUMANN, H., Onderzoekingen over phospho-monoesterase en pyrophosphatasen van het dierlijk organisme. Proefschrift Amsterdam 1948.

NOSALEVIC, O. M., Histochemische Untersuchungen der Aktivität der alkalischen und sauren Phosphatasen bei Präcancer und Krebs der Mamma. 1954 Arch. Path. *16:* H. 3. 75-76.

OLIVER, J., Cellulair mechanisms of protein metabolism in the nephron. 1954 J. of Exp. Med. *99:* 589-620.

OORT, J., TH. G. VAN RIJSSEL, Experimentele onderzoekingen over allergische ontsteking met behulp van fluorescerende eiwitten. 1960 N.T.v.G. *104:* 1805-1806.

PALADE, G. E., A small particulate component of the cytoplasm. 1955 J. Biophys. a. Biochem. Cytol. *1:* 59-68.

PEARSE, A. G. E., Histochemistry. Theoretical and applied. 2e druk 1960 J. & A. Churchill Ltd. London.

PEARSE, A. G. E., C. R. MACPHERSON, Renal histochemistry in potassium depletion. 1958 J. Path. & Bact. *75:* 69-81.

PEARSON, B., A. B. NOVIKOFF, T. G. MORRIONE, The histochemical localization of alkaline phosphatase during carcino-genesis in rats fed p-dimethyl-amino-benzene. 1950 Cancer Res. *10:* 557-565.

PEARSON, B., F. RICHARDSON, Differences in alkaline phosphatase activity and distribution among several transplantable mammary tumors in mice. 1952 Cancer Res. *12:* 287.

REAGAN, J. W., W. B. WENTZ, N. MACHICAO, Induced cancer of the cervix uteri in the mouse. 1955 Arch. Path. *60:* 451-456.

REV, K., L. REV, G. LEKOCZKY, Alkaline phosphatase activity of the epidermoid carcinoma of the portio and its changes due to the γ-rays of radium. 1952 Acta morph. *2:* 329-337.

REYNOLDS, M. D., H. M. LEMON, W. W. BYRNES, Copper resistant serum acid phosphatase I. Method and values in health and disease. 1956 Cancer Res. *16:* 943-950.

RICHARDSON, F. L., BJ. PEARSON, Alkaline phosphatase activity during carcino-genesis of mammary tumors in mice implanted with stilboestrol pellets. 1954 J. Nat. Canc. Inst. *14:* 1123-1135.

RICHTERICH, R., Der histochemische Nachweis der alkalischen Phosphatase. 1952 Acta Anat. *15:* 243-259.

RINEHART, J. F., S. K. ABUL-HAJ, An improved method for histologic demonstration of acid mucopolysaccharides in tissues. 1951 Arch. of Path. *52:* 189-195.

ROBISON, R., The probable significance of hexose phosphoric esters in ossification. 1923 Biochem. J. *17:* 286-293.

ROCHE, J., La phosphatase des os et le méchanisme général de l'ossification. 1946 Experientia *2:* 325-336.

ROCHE, J., N. THOAI, Alcaline phosphatase. 1950 Advances Enzymol. *10:* 83.

RUTENBURG, A. M., S. H. RUTENBURG, A. SELIGMAN, Histochemical demonstration of alkaline phosphatase with sodium-6-benzoyl-naphtyl phosphate. 1955 J. of Histochem. Cytochem. *3:* 394.

RUYTER, J. H. C., H. WEISMANN, A critical examination of the histochemical demonstration of the alkaline phosphomono-esterase. 1949 Biochem. et Biophys. Acta *3:* 125-135.

SCARPELLI, D. G., A. G. E. PEARSE, Physical and chemical protection of cell constituents and the precise localization of enzymes. 1958 J. Histochem. a. Cytochem. *6:* 369-379.

SCHAJOWICZ, F., R. L. CABRINI, Histochemical studies of bone in normal and pathological conditions. 1954 J. of Bone a. Joint Surg. *36B:* 474-489.

SCHAJOWICZ, F., R. L. CABRINI, The effects of acids (decalcifying solutions) and enzymes on the histochemical behaviour of bone and cartilage. 1955 J. Histochem. a. Cytochem. *3:* 122-129.

SCHLAMOWITZ, M., Immunochemical studies on alkaline phosphatase. 1958 Annals N.Y. Acad. Sc. *75:* 373-380.

SCHMIDT-MATTHIESEN, H., Siliciumdioxyd und die reaktive Entstehung von Bindegewebe. 1955 Virch. Arch. *327:* 419-459.

SCHNEIDER, W. C., E. L. KUFF, On the isolation and some biochemical properties of the Golgi substance. 1954 Amer. J. Anat. *94:* 209-224.

SHELDON, H., H. ZETTERQUIST, D. BRANDES, Histochemical reactions for electron microscopy: acid phosphatase. 1955 Exp. Cell. Res. *9:* 592-596.

STAEMMLER, M., B. KARHOFF, Die akuten Nephrosen. II. Nierenschäden durch Antibiotica. 1956 Virch. Arch. *328:* 481-502.

STOLL, P., H. EBNER, H. STRECKER, Vergleichende histochemische, histologische und cytologische Untersuchungen am weiblichen Generationstrakt. 1951 Arch. f. Gynäkologie *180:* 76-84.

STRAUS, W., Isolation and biochemical properties of droplets from the cells of rat kidney. 1954 J. of Biol. Chem. *207:* 745-755.

STRAUS, W., J. OLIVER, Cellular mechanisms of protein metabolism in the nephron. VI. The immunological demonstration of eggwhite in droplets and other cellular fractions of the rat kidney after intraperitoneal injection. 1955 J. Exp. Med. *101-102:* 1-9.

TAKAMATSU, H., Histochemische Untersuchungsmethodik der Phosphatase und deren Verteilung in verschiedenen Organen und Geweben. 1939 Transact. Soc. Path. Jap. *29:* 492-498.

THOMSEN, K., Histochemische Untersuchungen über die saure Phosphatase in der menschlichen Placenta. 1955 Arch. Gynäk. *187:* 264-281.

THOMSEN, K., H. BLANKENBURG, Über die Entwicklung und Rückbildung der Langhansschen Zellschicht in der menschlichen Placenta. 1956 Arch. Gyn. *187:* 638.

TREVAN, D. J., A. SHARROCK, Methylgreen pyronine-orange G stain for formaline fixed tissue. 1951 J. Path. Bact. *63:* 327-329.

VALENTINE, W. N., W. S. BECK, Phosphatase activity in health, leucocytosis and myelocytic leukemia. 1951 J. Lab. & Clin. Med. *38:* 39-55.

VALENTINE, W. N., W. S. BECK, J. H. FOLLETTE, H. MILLS, J. S. LAWRENCE, Biochemical studies in chronic myelocytic leukemia, polycythemia vera and other idiopathic myelo-proliferative disorders. 1952 Blood *7:* 959-977.

VALENTINE, W. N., Studies on leucocyte alkaline phosphatase activity; relation to „stress" and pituitary adrenal activity. 1954 J. Lab. & Clin. Med. *44:* 219-228.

VALENTINE, W. N., J. H. FOLLETTE, D. H. SOLOMON, J. REYNOLDS, The relationship of leukocyte alkaline phosphatase to „stress" to ACTH and to adrenal 17 OH corticosteroids. 1957 J. Lab. & Clin. Med. *49:* 723-737.

WILLIGHAGEN, R. G. J., Histochemisch en cytochemisch onderzoek van het uteruscarcinoom. 1956 Jaarboek Kankerbestrijding *6:* 175-188.

WILLIGHAGEN, R. G. J., Voordelen van de cryostaat voor het maken van vriescoupes van ongefixeerd weefsel. 1959 N.T.v.G. *103:* 697.

WILLIGHAGEN, R. G. J., H. T. PLANTEIJDT, Aminopeptidase activity in cancercells. 1959 Nature *183:* 4653-4654.

WILLIGHAGEN, R. G. J., Histochemisch onderzoek van enzymen in gezwellen. 1959 N.T.v.G. *103:* 2522.

WILLIGHAGEN, R. G. J., Histochemisch gezweldiagnostiek gedurende operaties. 1960 Jaarboek Kankerbestrijding *9:* 119-126.

WILMER, H. A., The disappearance of phosphatase from the hydronephrotic kidney. 1943 J. Exper. Med. *78:* 225-231.

WILMER, H. A., Renal phosphatase: The correlation between the functional activity of the renal tubule and its phosphatase content. 1944 Arch. Path. *37:* 227-237.

WILMER, H. A., Failure to demonstrate alkaline phosphatase activity in inclusion bodies by the histochemical technic. 1944 Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. *55:* 206.

WILTSHAW, E., W. C. MOLONEY, Histochemical and biochemical studies on leukocyte alkaline phosphatase activity. 1955 Blood *10:* 1120-1131.

WOLF, A., E. A. KABAT, W. NEWMAN, Histochemical studies on tissue enzymes. III. A study of the distribution of acid phosphatases with special reference to the nervous system. 1943 Am. J. Path. *19:* 423.

WOODARD, H. Q., W. C. MOLONEY, Quantitative studies of beta-glycerophosphatase activity in normal and neoplastic tissues. 1956 Cancer *9:* 352-366.

HISTOCHEMISCH ONDERZOEK VAN DE ACTIVITEIT VAN ALKALISCHE EN ZURE FOSFATASE IN NORMAAL EN IN PATHOLOGISCH VERANDERD MENSELIJK WEEFSE

AFBEELDINGEN